



Universidad de Oviedo

Programa de Doctorado en Biología Molecular y Celular
Reconstrucción de nervio periférico mediante el
uso de aloinjertos. Estudio experimental.

Marta de Juan Marín



Universidad de Oviedo

Programa de Doctorado en Biología Molecular y Celular
Reconstrucción de nervio periférico mediante el
uso de aloinjertos. Estudio experimental.

Marta de Juan Marín



RESUMEN DEL CONTENIDO DE TESIS DOCTORAL

1.- Título de la Tesis	
Español: Reconstrucción de nervio periférico mediante el uso de aloinjertos. Estudio experimental.	Inglés: Peripheral nerve repair with allografts. An experimental study

2.- Autor	
Nombre: Marta de Juan Marín	DNI/Pasaporte/NIE:
Programa de Doctorado: Biología Molecular y Celular.	
Órgano responsable: Universidad de Oviedo	

RESUMEN (en español)

INTRODUCCIÓN

Los injertos de nervio autólogos se consideran el tratamiento de elección para reparar lesiones de nervio periférico que no pueden subsanarse mediante sutura directa. La técnica consiste en extraer nervios sanos del paciente e interponerlos en el defecto que queremos reparar. Sin embargo, la fuente de injertos nerviosos de cada persona es limitada y la obtención de los mismos tampoco es inocua.

Actualmente, están disponibles en España varios conductos sintéticos biodegradables y un solo aloinjerto nervioso acelular como métodos alternativos al uso de autoinjertos. Este estudio pretende acometer la búsqueda de un aloinjerto nervioso acelular para la reparación de defectos segmentarios en nervios del sistema nervioso periférico. Para ello, el objetivo es demostrar que el aloinjerto acelular de nervio ciático en rata constituye una alternativa sencilla, eficaz y asequible a la reparación con nervio autólogo en defectos segmentarios del sistema nervioso periférico.

MATERIAL Y MÉTODOS

Se diseñó un estudio experimental con 32 ratas Wistar hembras distribuidas entre cuatro grupos experimentales de 8 ratas cada uno. El estudio se basó en la creación de un defecto unilateral de 14 mm en el nervio ciático del lado derecho de cada uno



de los animales, que fue reparado en el momento agudo con cuatro técnicas quirúrgicas diferentes. El primer grupo fue el control positivo, en el que para reparar el defecto nervioso se empleó un autoinjerto nervioso. En el segundo grupo se utilizó aloinjerto nervioso descelularizado liofilizado para tratar la lesión. Para reparar el defecto en el tercer grupo se utilizó aloinjerto nervioso descelularizado conservado en fresco y, finalmente, en el cuarto grupo se utilizó un tubo de silicona como injerto y se consideró como grupo de control negativo. Los aloinjertos nerviosos acelulares procedían del nervio ciático de ratas de la misma cepa y se elaboraron mediante un protocolo de descelularización basado en el uso de detergentes.

Para evaluar la regeneración, a las 14 semanas se realizaron las pruebas funcionales (índices funcionales y test de Rotarod) y, en la semana 20, se analizó la histología y la morfología del nervio ciático reparado, así como de los músculos de la extremidad trasera intervenida.

RESULTADOS

Los aloinjertos nerviosos acelulares consiguieron un grado de regeneración axonal similar al de los autoinjertos en un defecto de nervio ciático de rata de 14 mm. Los datos referidos a las variables funcionales no mostraron diferencias significativas entre los grupos. Los animales tratados con aloinjertos acelulares conservados en fresco y los correspondientes al grupo de autoinjertos fueron los que experimentaron menor atrofia muscular tras la reinervación, seguidos por los animales del grupo de aloinjertos liofilizados. Los animales tratados con conductos de silicona sufrieron el mayor grado de atrofia muscular. El diámetro de las fibras musculares también fue significativamente mayor en los animales tratados con aloinjertos acelulares frescos frente a aquellos en los que se utilizaron autoinjertos o aloinjertos procesados liofilizados. No se observó ningún caso de reacción inmunológica de rechazo y la viabilidad técnica de los aloinjertos fue óptima en todos los casos.

CONCLUSIONES

La regeneración axonal tras la reparación del nervio ciático con aloinjertos acelulares procesados no se diferencia de la regeneración axonal conseguida mediante autoinjertos en un defecto de nervio ciático de rata de 14 mm. La utilización de dos métodos de preservación de los nervios diferentes, fresco y liofilizado, podría afectar



a la reinervación muscular. La regeneración axonal observada no se correlaciona con los resultados obtenidos en las pruebas funcionales de los animales ni con los resultados histomorfológicos del músculo.

RESUMEN (en inglés)

INTRODUCTION

Autologous nerve grafts are the gold standard treatment in the repair of peripheral nerve injuries that are not amenable to end-to-end coaptation. The technique consists in harvesting an expendable nerve and use it as an autologous nerve graft to bridge a nerve gap. However, autografts are a limited resource and can result in donor-site defects

Currently, in Spain there are several nerve guidance conduits and just one acellular nerve allograft available as alternative methods for nerve defect repair. This study aims to search for an acellular nerve allograft as a potential “off-the-shelf” alternative to autografting. The main purpose is to show that processed nerve allografts from rats are a simple, affordable and effective substitute for autografts in a 14-mm rat sciatic nerve defect.

METHODS

Thirty-two female Wistar rats were randomized into four groups of 8 animals each. A 14-mm nerve defect was created in the right sciatic nerve of each animal and acutely repaired with four different options. The first group served as the positive control in which nerve defects were repaired with an isograft. The second group was managed with fresh acellular nerve grafts and lyophilized acellular nerve allografts were used in the third group. The fourth group served as the negative control and silicone conduits were implemented. Adult Wistar rats were used as donors for detergent-processed nerve allografts.

At 14 weeks post-operatively, every animal was functionally assessed (walking track analysis and Rotarod). At 20 weeks post-operatively, histomorphometric analysis of the grafted sciatic nerve as well as the hind leg muscles was conducted.



Universidad de Oviedo
Universidá d'Uviéu
University of Oviedo

RESULTS.

In a 14-mm sciatic nerve gap model, processed nerve allografts promoted a similar degree of axonal regeneration as autografts. Both autografts and fresh acellular nerve allografts had the lowest amount of muscle atrophy followed by the lyophilized nerve allograft group. Nerve defects with silicone conduits resulted in the greatest muscle atrophy. Fresh processed nerve allografts also had the largest muscle fibre diameter compared to the data showed for lyophilized processed allografts and isografts. At the terminal time point, there was no evidence of rejection or degeneration at the grafted nerve and all acellular nerve grafts were technically workable.

CONCLUSIONS

Axonal regeneration after sciatic nerve repair with processed acellular allografts does not differ from axonal regeneration achieved by autografts in a 14-mm rat sciatic nerve defect. The use of two different nerve preservation methods, fresh and freeze-dried, could affect muscle reinnervation. The axonal regeneration observed does not correlate with the results obtained in the functional tests nor with the histomorphological results of the hind leg muscle.

**SR. PRESIDENTE DE LA COMISIÓN ACADÉMICA DEL PROGRAMA DE
DOCTORADO EN BIOLOGÍA MOLECULAR Y CELULAR**



Universidad de Oviedo

Programa de Doctorado en Biología Molecular y Celular
Reconstrucción de nervio periférico mediante el
uso de aloinjertos. Estudio experimental.

Marta de Juan Marín

Oviedo 2021

Directores:

Daniel Camporro Fernández

Juan Argüelles Luís

A mi gran "familia asturiana"

/ AGRADECIMIENTOS

En primer lugar, me gustaría dar las gracias a mis directores de tesis, Juan Argüelles y Daniel Camporro, por su ayuda y dedicación durante estos años. Gracias por respetar mis tiempos con mucha paciencia y haber confiado en mí. Gracias por darme la libertad para llevar a cabo el proyecto que más me ilusionaba.

En segundo lugar, me gustaría agradecer el esfuerzo, la entrega y la disponibilidad incondicional de Marta Pevida, Sara Llames y Álvaro Meana, del Centro Comunitario de Sangre y Tejidos de Asturias. Su trabajo constituye la base fundamental sobre la que se sustenta este trabajo y representan la traslación de este modelo experimental en una realidad clínica.

También quiero mostrar mi gratitud a Maite Fernández, a la Dra. Aurora Astudillo y a Alicia Ribao. Gracias por haberme ayudado a procesar las muestras y a prepararlas para poder hacer un análisis histológico riguroso.

Gracias también a Marta Alonso y Ángel Martínez, de los servicios científico técnicos, por dedicarme vuestro tiempo y enseñarme a realizar la toma de imágenes y la recogida de las variables de estudio de forma sistemática.

Por supuesto, muchísimas gracias a todo el personal del Bioterio de la Universidad de Oviedo: Agustín, Teresa, Laura, Cristina, Conchi. Gracias por estar siempre disponibles con una sonrisa.

A todos mis amigos adjuntos y residentes del Servicio de Cirugía Plástica del Hospital Universitario Central de Asturias. Infinitas gracias por todo lo que me habéis enseñado, tanto quirúrgica como personalmente. Gracias por estar siempre dispuestos a ayudarme en la toma de muestras, a pesar de las horas intempestivas a las que se suelen hacer.

Por último, quiero dar las gracias a mi familia por la educación y el cariño recibidos desde pequeña. Me habéis transmitido el valor del esfuerzo, la constancia y la ilusión.

Gracias a todos los que, directa o indirectamente, me habéis ayudado a completar este trabajo.

/ LISTA DE TABLAS

- Tabla 1. Esquema del diseño experimental de los 4 grupos del estudio. De arriba a abajo: nombre del grupo, función del grupo, método de reparación y fuente u origen del método de reparación.
- Tabla 2. Material quirúrgico necesario para realizar la técnica quirúrgica.
- Tabla 3. Ejemplo de fichero .xlsx tras el análisis de un segmento de nervio ciático de rata. El muestreo del segmento habría obtenido 9 imágenes cuya área representa el 25% del área total del segmento de nervio analizado.
- Tabla 4. Variables histomorfológicas del nervio registradas. Sombreadas en gris, las variables obtenidas de forma semiautomatizada del programa Fiji.
- Tabla 5. Sistema de clasificación histológica del músculo.
- Tabla 6. Peso inicial y ganancia de peso desde el primer día de la cirugía hasta la semana 20 (gramos) en cada grupo experimental.
- Tabla 7. Valores de los índices funcionales del nervio ciático (SFI), del tibial (TFI) y del peroneo (PFI) para cada grupo. Entre paréntesis, el tamaño muestral de cada grupo para estas variables.
- Tabla 8. Tiempo de latencia (s) en el Rotarod en cada uno de los *trials* (T1-T4) y la media de los 4 *trials* en cada uno de los grupos (Total).
- Tabla 9. Velocidad (rpm) en el Rotarod en cada uno de los *trials* (T1-T4) y la media de los 4 *trials* en cada uno de los grupos (Total).
- Tabla 10. Indica el área muestreada (%) para el segmento medio y distal del nervio ciático de cada uno de los animales y el número de imágenes analizadas para calcular las variables histomorfológicas del nervio.
- Tabla 11. Ejemplo de archivo .xlsx resultante del análisis de las 12 imágenes del segmento distal de nervio ciático derecho de la rata identificada como I3 (grupo B), analizadas con el programa Fiji.

- Tabla 12. Variables histomorfológicas del nervio ciático sano correspondiente a la extremidad izquierda de 9 animales.
- Tabla 13. Número de axones normalizado en el segmento distal de los nervios analizados de cada grupo. La n indica el número de muestras incluidas en el análisis.
- Tabla 14. Número de axones normalizado en el segmento medio de los nervios analizados de cada grupo. La n indica el número de muestras incluidas en el análisis.
- Tabla 15. Densidad de fibras nerviosas (número de axones/100 μm^2) en el segmento distal de los nervios analizados de cada grupo. La n indica el número de muestras incluidas en el análisis.
- Tabla 16. Densidad de fibras nerviosas (número de axones/100 μm^2) en el segmento medio de los nervios analizados de cada grupo. La n indica el número de muestras incluidas en el análisis.
- Tabla 17. Diámetro de los axones (μm) en el segmento distal de los nervios analizados de cada grupo. La n indica el número de muestras incluidas en el análisis.
- Tabla 18. Diámetro de los axones (μm) en el segmento medio de los nervios analizados de cada grupo. La n indica el número de muestras incluidas en el análisis.
- Tabla 19. Área del axón (μm^2) en el segmento distal de los nervios analizados de cada grupo. La n indica el número de muestras incluidas en el análisis.
- Tabla 20. Área del axón (μm^2) en el segmento medio de los nervios analizados de cada grupo. La n indica el número de muestras incluidas en el análisis.
- Tabla 21. Espesor de la vaina de mielina (μm) en el segmento distal de los nervios analizados de cada grupo. La n indica el número de muestras incluidas en el análisis.

- Tabla 22. Espesor de la vaina de mielina (μm) en el segmento medio de los nervios analizados de cada grupo. La n indica el número de muestras incluidas en el análisis.
- Tabla 23. Porcentaje de tejido nervioso (%) en el segmento distal de los nervios analizados de cada grupo. La n indica el número de muestras incluidas en el análisis.
- Tabla 24. Porcentaje de tejido nervioso (%) en el segmento medio de los nervios analizados de cada grupo. La n indica el número de muestras incluidas en el análisis.
- Tabla 25. Índice de regeneración del nervio ciático en cada uno de los grupos experimentales
- Tabla 26. Peso relativo (%) del músculo gastrocnemio medial derecho con respecto al izquierdo en cada uno de los cuatro grupos.
- Tabla 27. Peso relativo (%) del músculo tibial anterior derecho con respecto al izquierdo en cada uno de los cuatro grupos.
- Tabla 28. Puntuación final de cada grupo en la clasificación histológica del músculo gastrocnemio medial.
- Tabla 29. Frecuencias relativas (%) y frecuencias absolutas (entre paréntesis) de las variables que conforman la clasificación histológica del músculo gastrocnemio medial. 0 = nada de tejido muscular afectado. 1 = $\leq 50\%$ tejido muscular afectado. 2 = $> 50\%$ tejido muscular afectado. Con asterisco se destaca las diferencias que fueron estadísticamente significativas.
- Tabla 30. Diámetro de las fibras musculares (μm) del músculo gastrocnemio medial derecho en cada grupo. Con asterisco se señalan los grupos que presentaron diferencias significativas con respecto al grupo control positivo (A).

/ LISTA DE GRÁFICOS

- Gráfico 1. Diagrama de cajas que representa el peso inicial (gramos) de los animales de cada grupo antes de comenzar la cirugía inicial.
- Gráfico 2. Diagrama de cajas que representa los valores del índice funcional del ciático en cada grupo.
- Gráfico 3. Diagrama de cajas que representa el valor del índice funcional del tibial en cada grupo.
- Gráfico 4. Diagrama de cajas que representa los valores del índice funcional del peroneo en cada grupo.
- Gráfico 5. Diagrama de cajas que representa el tiempo medio de latencia (s) en el Rotarod para cada grupo.
- Gráfico 6. Diagrama de cajas que representa la velocidad media (rpm) en el Rotarod para cada grupo experimental.
- Gráfico 7. Diagrama de cajas que representa el número de axones normalizado (n) en el segmento distal de cada grupo experimental (A-D).
- Gráfico 8. Diagrama de cajas que representa el número de axones normalizado (n) en el segmento medio de cada grupo experimental (A-C).
- Gráfico 9. Diagrama de cajas que representa la densidad de fibras nerviosas (número de axones/100 μm^2) en el segmento distal de cada grupo experimental (A-D).
- Gráfico 10. Diagrama de cajas que representa la densidad de fibras nerviosas (número de axones/100 μm^2) en el segmento medio de cada grupo experimental (A-C).
- Gráfico 11. Diagrama de cajas que representa el diámetro de los axones (μm) en el segmento distal de cada grupo experimental (A-D).

- Gráfico 12. Diagrama de cajas que representa el área de los axones (μm^2) en el segmento distal de nervio ciático de cada grupo experimental (A-D).
- Gráfico 13. Diagrama de cajas que representa el porcentaje de tejido nervioso en el segmento distal de nervio ciático de cada grupo experimental (A-D).
- Gráfico 14. Diagrama de cajas que representa el porcentaje de tejido nervioso en el segmento medio de nervio ciático de cada grupo experimental (A-C).
- Gráfico 15. Diagrama de cajas que representa el peso relativo (%) del músculo gastrocnemio medial derecho con respecto al izquierdo en cada grupo.
- Gráfico 16. Diagrama de cajas que representa el peso relativo (%) del músculo tibial anterior derecho con respecto al izquierdo en cada grupo.
- Gráfico 17. Diagrama de cajas que representa la puntuación total en la clasificación histológica del músculo gastrocnemio medial derecho en cada grupo.
- Gráfico 18. Diagrama de barras que representa las frecuencias relativas y absolutas de animales con atrofia de fibras musculares en cada uno de los cuatro grupos A-D. La altura de la barra indica la frecuencia relativa representada en el eje vertical. En color verde aquellos que no presentaban atrofia (puntuación 0), en amarillo los que presentaban atrofia muscular en $\leq 50\%$ de su tejido (puntuación 1) y en rojo aquellos que tenían $>50\%$ de su tejido con atrofia de fibras (puntuación 2).
- Gráfico 19. Diagrama de barras que representa las frecuencias relativas y absolutas de los animales de cada grupo A-D según la presencia de núcleos centrales en el músculo gastrocnemio medial derecho. La altura de la barra indica la frecuencia relativa representada en el eje vertical. En color verde aquellos que no presentaban núcleos centrales (puntuación 0), en amarillo los que presentaban núcleos centrales en $\leq 50\%$ de su músculo (puntuación 1) y en rojo aquellos que tenían $>50\%$ de su tejido muscular con núcleos centrales (puntuación 2).
- Gráfico 20. Diagrama de barras que representa las frecuencias relativas y absolutas de los animales de cada grupo según la cantidad de colágeno en el

gastrocnemio medial derecho. La altura de la barra indica la frecuencia relativa representada en el eje vertical. En color verde aquellos que no presentaban colágeno (puntuación 0), en amarillo los que presentaban depósito de colágeno en $\leq 50\%$ de su tejido (puntuación 1) y en rojo aquellos que tenían $>50\%$ de su tejido con depósito de colágeno (puntuación 2).

- Gráfico 21. Diagrama de barras que representa las frecuencias relativas y absolutas de los animales de cada grupo según la infiltración grasa en el gastrocnemio medial derecho. La altura de la barra indica la frecuencia relativa representada en el eje vertical. En color verde aquellos que no presentaban infiltración grasa (puntuación 0), en amarillo los que presentaban infiltración de grasa en $\leq 50\%$ de su tejido muscular (puntuación 1) y en rojo aquellos que tenían $>50\%$ de su tejido muscular infiltrado de grasa (puntuación 2).
- Gráfico 22. Diagrama de cajas que representa el diámetro de las fibras musculares (μm) del músculo gastrocnemio medial derecho en cada grupo.

/ LISTA DE ILUSTRACIONES

- Ilustración 1. Esquema gráfico de la reparación del defecto de 14 mm del nervio ciático derecho en ratas según el grupo experimental. El degradado del segundo modelo representa la rotación de 180° del autoinjerto de nervio ciático. La izquierda de la imagen es la zona proximal.
- Ilustración 2. Fotografía del abordaje para la obtención de los nervios ciáticos de ambos lados y de los músculos en un animal del grupo C. En la primera imagen se observa la línea fascial entre glúteo superficial y bíceps femoral. En la segunda, nervio ciático expuesto en ambos lados tras sección y retracción de bíceps femoral. En la tercera, detalle de ambos nervios ciáticos.
- Ilustración 3. Cambios en la marcha asociados con lesiones selectivas del nervio tibial posterior, peroneo y ciático. Imagen tomada del artículo original firmado por Bain et al. 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.
- Ilustración 4. Fórmula para el cálculo del índice funcional del ciático descrita por Bain en 1989 resultante de una regresión lineal múltiple. EPL: experimental print length. NPL: normal print length. ETS: experimental toe spread. NTS: normal toe spread. EIT: experimental intermediary toe spread. NIT: normal intermediary toe spread.
- Ilustración 5. Fórmula para el cálculo del índice funcional del tibial descrita por Bain en 1989 resultante de una regresión lineal múltiple (12). EPL: *experimental print length*. NPL: *normal print length*. ETS: *experimental toe spread*. NTS: *normal toe spread*. EIT: *experimental intermediary toe spread*. NIT: *normal intermediary toe spread*.
- Ilustración 6. Fórmula para el cálculo del índice funcional del tibial descrita por Bain en 1989 resultante de una regresión lineal múltiple (12). EPL: *experimental print length*. NPL: *normal print length*. ETS: *experimental toe spread*. NTS: *normal toe spread*.

- Ilustración 7. Esquema del nervio ciático derecho de una rata. El segmento rayado se corresponde con el defecto nervioso de 14 mm reparado. En gris, los puntos en los que se toman las muestras para el segmento proximal (izquierda), medio (segmento rayado) y distal (derecha). Las flechas simbolizan la trifuración terminal del ciático en nervio tibial, peroneo y sural.
- Ilustración 8. A la izquierda, corte semifino teñido con azul de toluidina a 1000 aumentos. La imagen original digitalizada y en la derecha, la imagen una vez aplicado el umbral de segmentación por defecto que tiene el programa. Abajo, el umbral de segmentación ajustado manualmente a demanda. En rojo, la vaina de mielina de las fibras.
- Ilustración 9. Corte semifino de segmento distal de rata teñido con azul de toluidina 1% a 1000 aumentos. Resaltado en verde aparece el contorno del axón. Nótese como las fibras que intersectan el borde inferior y el derecho no están marcadas ni se contabilizan.
- Ilustración 10. Fotografía tomada 24 horas después de la intervención. Se observa dehiscencia completa de la sutura muscular con exposición del nervio ciático reparado y autotomía en extremidad trasera derecha. Se procedió a la eutanasia del animal.
- Ilustración 11. Fotografía de animales B2 y E3 del grupo A (control positivo) en decúbito prono en la semana 20 antes de la obtención de las muestras de nervio y músculo.
- Ilustración 12. Detalle de la planta del pie derecho en animales del grupo A en la semana 20. Destaca la actitud en garra de todos los dedos.
- Ilustración 13. Fotografía de animales D1 (izquierda) y D2 (derecha) del grupo B (aloinjerto acelular liofilizado) en decúbito prono en la semana 20 antes de la obtención de las muestras de nervio y músculo.
- Ilustración 14. Fotografía del animal K2 del grupo C (aloinjerto acelular fresco) en decúbito prono en la semana 20 antes de la obtención de las muestras de nervio y músculo. A la derecha, detalle de las extremidades traseras.

- Ilustración 15. Fotografía de animales C2 (izquierda) y D3 (derecha) del grupo D (control negativo) en decúbito prono en la semana 20 antes de la obtención de las muestras de nervio y músculo.
- Ilustración 16. Fotografía detallada de las extremidades traseras del animal D3 (grupo D).
- Ilustración 17. Fotografía tomada 24 horas después de la intervención inicial. Se observa dehiscencia de herida quirúrgica que no expone nervio ciático. Se procedió a su limpieza y cierre de nuevo.
- Ilustración 18. Fotografía en la semana 20 del animal del grupo B en decúbito prono en la que se observa tumoración en la planta de la extremidad trasera derecha.
- Ilustración 19. Corte longitudinal de nervio ciático sano de rata control teñido con hematoxilina-eosina visto a microscopía óptica con magnificación 100x.
- Ilustración 20. Corte transversal de nervio ciático sano de rata control teñido con hematoxilina-eosina visto a microscopía óptica con magnificación 100x.
- Ilustración 21. Corte longitudinal de nervio ciático sano de rata normal teñido con DAPI visto con microscopia de fluorescencia y magnificación 100x.
- Ilustración 22. Corte transversal de nervio ciático sano de rata normal teñido con DAPI visto con microscopia de fluorescencia y magnificación de 100x.
- Ilustración 23. Corte longitudinal (izquierda) y transversal (derecha) de nervio ciático sano de rata control teñido con hematoxilina-eosina visto a microscopía óptica con magnificación 200x.
- Ilustración 24. Corte longitudinal (izquierda) y transversal (derecha) de nervio ciático sano de rata control teñido con DAPI visto con microscopía de fluorescencia y magnificación de 200x.
- Ilustración 25. Corte transversal de aloinjerto acelular fresco de nervio ciático de rata teñido con hematoxilina-eosina visto a microscopía óptica con magnificación 50x.

- Ilustración 26. Corte transversal de aloinjerto acelular fresco de nervio ciático de rata teñido con hematoxilina-eosina visto a microscopía óptica con magnificación 100x.
- Ilustración 27. Corte longitudinal de aloinjerto acelular de nervio ciático de rata teñido con hematoxilina-eosina visto a microscopía óptica con magnificación 100x.
- Ilustración 28. Corte longitudinal de aloinjerto acelular de nervio ciático de rata teñido con DAPI y fotografiado con microscopio de fluorescencia y magnificación de 100x.
- Ilustración 29. Corte longitudinal de aloinjerto acelular de nervio ciático de rata teñido con hematoxilina-eosina visto a microscopía óptica y magnificación de 200x.
- Ilustración 30. Corte longitudinal de aloinjerto acelular de nervio ciático de rata teñido con DAPI y fotografiado con microscopio de fluorescencia y magnificación de 200x.
- Ilustración 31. Imágenes de microscopía electrónica de barrido de corte transversal de aloinjerto acelular de nervio ciático tras procesamiento y descelularización según el protocolo descrito.
- Ilustración 32. Foto del análisis de la pisada de las extremidades traseras en una rata del grupo A. En azul, la extremidad trasera izquierda y en rojo, la derecha.
- Ilustración 33. Foto del análisis de la pisada de las extremidades traseras en una rata del grupo B. En azul, la extremidad trasera izquierda y en rojo, la derecha.
- Ilustración 34. Imagen escaneada del análisis de la pisada de las extremidades traseras en una rata del grupo C. En azul, la extremidad trasera izquierda y en rojo, la derecha.
- Ilustración 35. Foto del análisis de la pisada de las huellas traseras de una rata del grupo D. En azul, la extremidad trasera izquierda y en rojo, la derecha.

- Ilustración 36. Ejemplo de imágenes capturadas. A la izquierda, corte transversal semifino del segmento distal del nervio ciático de una rata del grupo A (animal nº1) teñido con azul de toluidina visto a 1000x. A la derecha, corte transversal semifino del segmento medio del nervio ciático del mismo animal teñido con azul de toluidina visto a 1000x
- Ilustración 37. A la izquierda, corte transversal semifino del segmento medio del nervio ciático de una rata del grupo C (animal nº 19). A la derecha, corte transversal semifino del segmento medio del nervio ciático de una rata del grupo C (animal nº 21), ambos teñidos con azul de toluidina y vistos a 1000x. Se observa que las muestras no tienen la calidad suficiente como para analizarse.
- Ilustración 38. Captura de pantalla del programa Fiji ejecutando la macro. Se observa corte transversal de segmento distal de un animal del grupo B teñido con azul de toluidina visto a 1000x. Resaltado en verde los axones seleccionados automáticamente por el programa.
- Ilustración 39. Captura de pantalla del programa Fiji. Corte transversal de segmento distal de un animal del grupo B teñido con azul de toluidina 1000x. Se observa resaltado en verde los axones seleccionados tras haber añadido manualmente algún axón (estrella blanca).
- Ilustración 40. Fotografía de músculo tibial anterior izquierdo (sano) en animal del grupo A en la semana 20.
- Ilustración 41. Fotografía de músculo tibial anterior del lado derecho (a la derecha de la imagen) y del tibial anterior izquierdo (a la izquierda de la imagen) en un animal del grupo D en la semana 20.
- Ilustración 42. Fotografía de músculo gastrocnemio medial derecho en animal del grupo A en la semana 20.
- Ilustración 43. Corte transversal de músculo gastrocnemio medial izquierdo (izquierda de la imagen) y derecho (derecha de la imagen) de un animal del grupo A (rata A2) en la semana 20. Teñido con hematoxilina-eosina y visto en microscopio óptico a 200x.

- Ilustración 44. Corte transversal de músculo gastrocnemio medial izquierdo (izquierda de la imagen) y derecho (derecha de la imagen) de un animal del grupo B (rata K3) en la semana 20. Teñido con hematoxilina-eosina y visto en microscopio óptico a 200x.
- Ilustración 45. Corte transversal de músculo gastrocnemio medial izquierdo (izquierda de la imagen) y derecho (derecha de la imagen) de un animal del grupo C (rata J1) en la semana 20. Teñido con hematoxilina-eosina y visto en microscopio óptico a 200x.
- Ilustración 46. Corte transversal de músculo gastrocnemio medial izquierdo (izquierda de la imagen) y derecho (derecha de la imagen) de un animal del grupo D (rata C1) en la semana 20. Teñido con hematoxilina-eosina y visto en microscopio óptico a 200x. Se observan signos de atrofia muscular con células musculares más pequeñas y atrofiadas con formas angulares.
- Ilustración 47. Corte transversal de músculo gastrocnemio medial izquierdo sano (izquierda de la imagen) y derecho (derecha de la imagen) de un animal del grupo A (rata A2) en la semana 20. Teñido con tricrómico de Gomori y visto en microscopio óptico a 200x.
- Ilustración 48. Corte transversal de músculo gastrocnemio medial izquierdo sano (izquierda de la imagen) y derecho (derecha de la imagen) de un animal del grupo B (rata K3) en la semana 20. Teñido con tricrómico de Gomori y visto en microscopio óptico a 200x.
- Ilustración 49. Corte transversal de músculo gastrocnemio medial izquierdo sano (izquierda de la imagen) y derecho (derecha de la imagen) de un animal del grupo C (rata J1) en la semana 20. Teñido con tricrómico de Gomori y visto en microscopio óptico a 200x.
- Ilustración 50. Corte transversal de músculo gastrocnemio medial izquierdo sano (izquierda de la imagen) y derecho (derecha de la imagen) de un animal del grupo D (rata C1) en la semana 20. Teñido con tricrómico de Gomori y visto en microscopio óptico a 200x.

/ ÍNDICE

1/ INTRODUCCIÓN	34
2/ HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	42
/ HIPÓTESIS DE TRABAJO	42
/ OBJETIVOS	42
3/ MATERIAL Y MÉTODOS	46
/ DISEÑO	46
/ ANIMALES	47
/ JUSTIFICACIÓN DEL MODELO	47
/ ALOJAMIENTO Y CUIDADO DE ANIMALES	48
/ JUSTIFICACIÓN DEL TAMAÑO MUESTRAL	50
/ PREPARACIÓN DEL INJERTO	50
/ PROTOCOLO DE DESCELULARIZACIÓN	51
/ TÉCNICA QUIRÚRGICA	51
/ PRUEBAS FUNCIONALES	56
/ HISTOMORFOLOGÍA DEL NERVIO	60
/ HISTOMORFOLOGÍA MUSCULAR	67
/ ESTADÍSTICA	68

4/ RESULTADOS	72
/ ANIMALES	72
/ ALOJAMIENTO Y CUIDADO DE ANIMALES	76
/ PROTOCOLO DE DESCELULARIZACIÓN	78
/ TÉCNICA QUIRÚRGICA	85
/ PRUEBAS FUNCIONALES	85
/ HISTOMORFOLOGÍA DEL NERVIO	95
/ HISTOMORFOLOGÍA MUSCULAR	112
5/ DISCUSIÓN	127
/ ANIMALES	127
/ PRUEBAS FUNCIONALES	127
/ HISTOMORFOLOGÍA DEL NERVIO	131
/ HISTOMORFOLOGÍA MUSCULAR	137
6/ CONCLUSIONES	144
7/ BIBLIOGRAFÍA	147
8/ ANEXO	156

1/ INTRODUCCIÓN

1/ INTRODUCCIÓN

El concepto de nervio periférico hace referencia a todos aquellos nervios que están fuera del cerebro y de la médula espinal y cuya misión es conectar al sistema nervioso central con las extremidades y órganos. Las lesiones que afectan a los nervios periféricos abarcan desde la parálisis del plexo braquial, encargado de controlar los músculos de la mano, antebrazo, brazo y hombro, pasando por las parálisis braquiales obstétricas, hasta las lesiones aisladas de un único nervio. Las causas pueden ser traumáticas, iatrogénicas, tumorales, compresivas o idiopáticas y el tratamiento más adecuado depende del tiempo de evolución, del tipo de lesión y de su localización. Asimismo, las amputaciones de cualquier miembro generan múltiples lesiones de nervios periféricos simultáneamente. Se localizan en el extremo proximal de cada nervio seccionado y reciben el nombre de neuroma, esto es, un conjunto de axones desorganizados embebidos en cicatriz que puede derivar en dolor neuropático crónico o en un dolor de miembro fantasma (1).

Las lesiones de nervio periférico afectan hasta el 3% de todos los pacientes con traumatismos (2–5). Anualmente, solo en Estados Unidos se producen más de 200.000 lesiones nerviosas como consecuencia de traumatismos (6). La mayoría de estas lesiones nerviosas afectan a la extremidad superior y entre un 1-3% de los traumatismos de miembro superior asociarán lesiones nerviosas en los primeros meses tras el traumatismo (7).

Igualmente, a nivel mundial se llevan a cabo más de 1 millón de amputaciones al año como consecuencia de tumores o enfermedades crónicas (diabetes mellitus, enfermedad vascular periférica) y se espera que la cifra aumente hasta los 3,6 millones de personas para 2050 (6). La mayoría de estos pacientes padecerá alguna forma de dolor crónico, bien en la extremidad remanente o bien en forma de dolor de miembro fantasma percibido en la parte del cuerpo amputada (1). La prevalencia de dolor crónico en la extremidad oscila entre el 10-76%, mientras que las tasas de dolor de miembro fantasma ascienden hasta el 85%. Todo ello conlleva una peor adaptación a las prótesis, una disminución de la calidad de vida y la necesidad de tratamiento farmacológico crónico (1,7–12).

A pesar de la amplia investigación en el campo de la neurociencia y la cirugía, la mejoría de los resultados funcionales obtenidos tras la reparación de las lesiones nerviosas continúa siendo un desafío. En las lesiones más complejas de un nervio, tronco o raíz nerviosa, el mecanismo de lesión o el desbridamiento necesario de la zona cicatricial genera un defecto segmentario entre los dos extremos del nervio que debe subsanarse. Generalmente, el tratamiento estándar de los defectos nerviosos en los que no se puede realizar una sutura directa sin tensión es la realización de injertos de nervio autólogos o autoinjertos. En caso de que las lesiones nerviosas sean muy proximales y los axones tengan que recorrer largas distancias hasta alcanzar el órgano diana, las transferencias nerviosas constituyen el tratamiento de elección (12).

Para la realización de injertos de nervio autólogo, la técnica consiste en extraer nervios sanos del paciente e interponerlos en el defecto que queremos reparar. De esta forma, se sacrifica la función de uno o varios nervios del propio paciente para intentar reparar otro cuya función se considera prioritaria. No obstante, la fuente de injertos nerviosos de cada persona no es ilimitada y la obtención de los mismos tampoco es inocua.

Pese a la gran utilidad demostrada por los autoinjertos para evitar las suturas directas con tensión, también existen desventajas asociadas a su uso. La probabilidad de alcanzar una recuperación funcional motora o sensitiva aceptable es del 50%. Además, las fuentes de injertos de cada persona son limitadas y puede haber una discrepancia de calibre entre el injerto obtenido y el nervio a reparar, obteniendo una reparación insatisfactoria. Igualmente, la zona donante del injerto deja un área de déficit funcional permanente, requiere de una segunda incisión quirúrgica, puede derivar en la formación de un neuroma sintomático y añade tiempo y coste al procedimiento (13). Todos estos inconvenientes han impulsado la búsqueda continuada de un sustituto nervioso para los autoinjertos.

Millesi estableció que el injerto nervioso ideal debía reunir las siguientes características: estar disponible en grandes cantidades, estar compuesto por estroma con la estructura y las propiedades mecánicas del endoneuro y contener fibroblastos, capilares y células de Schwann autólogas, preferentemente del nervio a reparar (14).

Con la propuesta de injerto ideal en mente, la comunidad científica ha ido desarrollando sustitutos que permitan la regeneración nerviosa. Tras la aparición de terapias inmunosupresoras aceptables, la utilización de aloinjertos nerviosos de cadáver

se convirtió en una posible alternativa a principios de los años 90 (14–16). Sin embargo, la morbilidad asociada al tratamiento inmunosupresor crónico necesario para evitar el rechazo ha relegado su uso a casos muy puntuales. De entre todas las opciones desarrolladas hasta la fecha, los aloinjertos nerviosos procesados y los conductos se han convertido en las alternativas más utilizadas en la práctica clínica.

Los conductos o tubos guía son estructuras tubulares que encapsulan y facilitan el crecimiento celular y axonal entre los extremos del nervio y crean un ambiente propicio para la regeneración nerviosa (15). Los tubos permiten el alineamiento macroscópico de los dos extremos del nervio y contienen el fluido que surge del nervio seccionado. Este fluido forma una matriz que soporta la migración de las células entre los dos cabos del nervio. Su principal inconveniente es que, si la distancia es larga o el calibre del nervio demasiado grande, el cable que se forma es fino y el nervio regenerado adopta la forma de un reloj de arena. Esta limitación para la regeneración axonal está presente tanto en los primeros tubos de silicona sintetizados como en los conductos biodegradables más modernos (13).

Actualmente, hay aprobados para su uso en humanos hasta 7 conductos diferentes, todos ellos con características similares (12). Son tubos semipermeables y biodegradables de colágeno o poliéster que permiten la difusión de oxígeno y micronutrientes al interior de la matriz de fibrina. Tras numerosos estudios, su uso en la práctica clínica se reserva para: defectos nerviosos no críticos de <1 cm en nervios digitales, protección de suturas nerviosas y puente de unión temporal hasta la reconstrucción definitiva en heridas no subsidiarias de reparación urgente (13,16,17).

Recientemente, los aloinjertos nerviosos acelulares o aloinjertos nerviosos procesados se han impuesto al uso de conductos e incluso al de autoinjertos nerviosos en determinados casos. Se estima que alrededor de un 70% de cirujanos de mano norteamericanos usan aloinjertos acelulares en su práctica clínica habitual (18). Los injertos de nervio acelulares son estructuras que conservan gran parte de las proteínas de la matriz extracelular al tiempo que reducen al mínimo el contenido de restos celulares que pueden producir una reacción de rechazo inmunológico en el huésped. Su principal ventaja es que, a pesar de no contener células, mantienen una matriz extracelular organizada muy similar a la matriz de los nervios nativos que sirve de soporte para la migración celular y la angiogénesis. Esta última característica es la que les otorga superioridad frente a los conductos comercializados (3,19). Su principal

diferencia con respecto a los injertos de nervio autólogos es que estos contienen células nativas y que deben llevar a cabo un proceso de degeneración (degeneración walleriana) previo antes de ser colonizados por el nuevo frente de regeneración nerviosa, mientras que los aloinjertos procesados son acelulares y ya han sufrido ese proceso de predegeneración antes de implantarse (13).

Existen numerosos métodos de procesamiento de nervios a partir de aloinjertos nerviosos de cadáver tales como la liofilización, la criopreservación, la congelación-descongelación, procesamiento con detergentes y la irradiación (20). El primero en obtener un aloinjerto nervioso acelular de cadáver humano mediante el uso de detergentes fue Johnson en los años 80 (21). Posteriormente, Sondell mejoró el proceso de descelularización empleando dos detergentes: Triton X-100 y desoxicolato de sodio (anión) (22). En 2004, Hudson elaboró un nuevo protocolo combinando tres detergentes: Triton X-200, sulfobetaine-10 y sulfobetaine-16, con resultados superiores a los presentados por Sondell (23,24). Finalmente, en 2008 el método de Hudson se completó añadiendo la enzima condroitinasa ABC para eliminar el proteoglicano condroitin-6-sulfato, glicoproteína localizada en la lámina basal que inhibe la regeneración axonal e incrementan el riesgo de regeneración aberrante, obteniendo el único aloinjerto nervioso acelular comercializado hasta la fecha: Avance de AxoGen® (AxoGen, Inc., Alachua, Florida) (3,13). Este producto debe conservarse a temperaturas de $< -40^{\circ}\text{C}$, se comporta como un injerto, por lo que tienen que utilizarse en lechos bien vascularizados y el límite de longitud comercial es de 70 mm.

El resultado final de cualquier reparación nerviosa está influenciado por una serie de variables entre las que se incluyen la distancia que deben superar los axones, la disminución en la capacidad de regeneración axonal asociada al paso del tiempo, el crecimiento aberrante de los axones, la atrofia de los órganos diana, el tamaño del defecto, el calibre del nervio implicado y la naturaleza del nervio (sensitivo, motor o mixto) (19,25–27). En líneas generales, los autoinjertos permiten obtener resultados más consistentes y superiores a los conseguidos por los dispositivos alternativos disponibles. De hecho, si se ordenan jerárquicamente, los autoinjertos consiguen el mayor grado de regeneración axonal a través del defecto nervioso, seguido de los aloinjertos nerviosos acelulares y, en último lugar, estarían los conductores o tubos (28,29). Pese a ello, existen situaciones clínicas en las que se prioriza el uso de las alternativas frente a los autoinjertos. Por ejemplo, en aquellos casos en los que la obtención de un injerto de nervio del paciente sea contraproducente, esto es, que se

sacrifique un nervio de pequeño calibre que recoja la sensibilidad no crítica de un territorio para reparar otro nervio sensitivo, no crítico y de pequeño tamaño. Otra situación en la que se preferiría el uso de aloinjertos acelulares o conductos es en pacientes que ya padecen un síndrome de dolor crónico, ya que el muñón del nervio donante tendría altas probabilidades de convertirse en un neuroma doloroso. Este tipo de situaciones en las que el daño que se pueda ocasionar al obtener el injerto nervioso sea superior al beneficio potencial del uso del autoinjerto justifican la utilización de los sustitutos nerviosos.

Finalmente, también hay que tener en cuenta el coste total de cualquiera de los tres métodos. El precio de los aloinjertos procesados y los conductos oscila entre 1000 \$ y 2200 \$ para longitudes similares. En el Hospital Universitario Central de Asturias, cada hora de quirófano tiene un coste de 711,74 € (30). Teniendo en cuenta que para obtener un injerto autólogo de nervio sural o de nervio cutáneo antebraquial medial (nervios utilizados frecuentemente en la práctica clínica como autoinjertos) se tardaría alrededor de 30 minutos, los métodos alternativos podrían suponer un ahorro con respecto al tratamiento estándar, sobre todo si al coste final del tratamiento con autoinjertos también se le añade el coste adicional de las complicaciones derivadas de la zona donante del injerto (13,31,32).

Por todo lo anteriormente expuesto, es fundamental establecer las indicaciones clínicas actuales de los aloinjertos nerviosos acelulares:

- Injerto de defectos nerviosos sensitivos no críticos (33).
- Tratamiento de dolor crónico de la extremidad o dolor de miembro fantasma: resección del neuroma y trasposición del mismo conectando el extremo del nervio a un segmento de 5 cm de aloinjerto procesado. De esta forma se consigue alejar el neuroma del cabo proximal del punto de irritación y se proporciona un ambiente propicio para que los axones se agoten en el aloinjerto, evitando la formación de un nuevo neuroma (34,35).
- Injertos de extensión en transferencias termino-laterales sensitivas en casos de sensibilidad rudimentaria o cuando no hay nervio autólogo disponible (13,36).

- Defectos distales en nervios mixtos (mediano, cubital) de menos de 5 cm, en pacientes no subsidiarios de extracción autoinjertos (surales) debido a sus comorbilidades (úlceras varicosas, isquemia de miembros inferiores, etc.).

2/ HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

/ HIPÓTESIS DE TRABAJO

/ OBJETIVOS

2/ HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

/ HIPÓTESIS DE TRABAJO

Este estudio pretende acometer la búsqueda de sustitutos nerviosos alternativos a los injertos de nervio autólogos para la reparación de defectos segmentarios en nervios del sistema nervioso periférico.

Para ello, se comparó el grado de regeneración nerviosa logrado en un defecto de nervio periférico reparado mediante aloinjerto nervioso acelular en contraposición a la técnica estándar actual, los injertos nerviosos autólogos.

La cuestión clave planteada en la investigación es demostrar que el aloinjerto acelular de nervio ciático en rata constituye una alternativa sencilla y eficaz a la reparación con nervio autólogo en defectos segmentarios del sistema nervioso periférico.

/ OBJETIVOS

Objetivo principal:

- Comparar el grado de regeneración nerviosa obtenido con aloinjertos acelulares y con autoinjerto mediante variables histomorfológicas del nervio, histomorfológicas del músculo y pruebas funcionales.

Objetivos específicos:

- Sentar las bases para desarrollar aloinjertos acelulares de donantes humanos.
- Comparar dos métodos diferentes de preservación de aloinjertos nerviosos acelulares: en fresco o liofilizados.
- Evaluar la correlación existente entre las variables histomorfológicas del nervio y las histomorfológicas del músculo.

- Evaluar la correlación existente entre las variables histomorfológicas del nervio y las pruebas funcionales.
- Evaluar la correlación existente entre las variables histomorfológicas del músculo y las pruebas funcionales.
- Desarrollar una herramienta de análisis histomorfológico semiautomatizada para estudios en el sistema nervioso periférico.

3/ MATERIAL Y MÉTODOS

/ DISEÑO

/ ANIMALES

/ JUSTIFICACIÓN DEL MODELO

/ ALOJAMIENTO Y CUIDADO DE ANIMALES

/ JUSTIFICACIÓN DEL TAMAÑO MUESTRAL

/ PREPARACIÓN DEL INJERTO

/ PROTOCOLO DE DESCELULARIZACIÓN

/ TÉCNICA QUIRÚRGICA

/ PRUEBAS FUNCIONALES

/ HISTOMORFOLOGÍA DEL NERVIO

/ HISTOMORFOLOGÍA MUSCULAR

/ ESTADÍSTICA

3/ MATERIAL Y MÉTODOS

/ DISEÑO

Se diseñó un estudio experimental con 32 ratas Wistar hembras, distribuidas pseudoaleatoriamente entre cuatro grupos experimentales de 8 ratas cada uno. El estudio experimental se basó en la creación de un defecto unilateral de 14 mm en el nervio ciático del lado derecho de cada uno de los animales de experimentación, que fue reparado en el momento agudo con cuatro técnicas quirúrgicas diferentes.

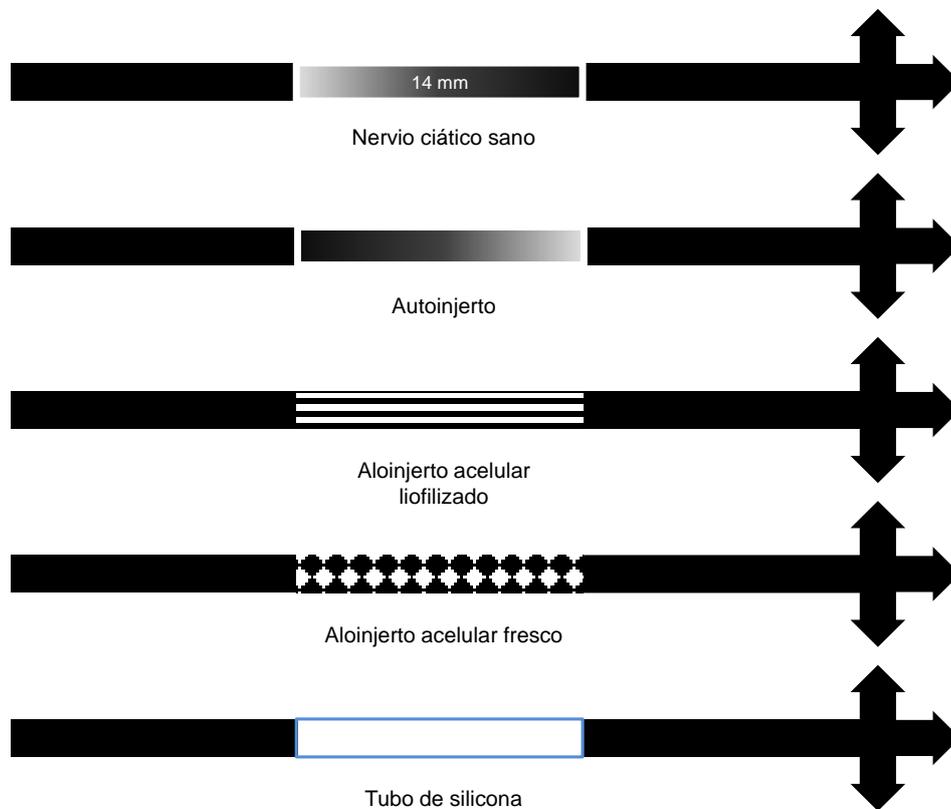
El primer grupo fue el control positivo, en el que para reparar el defecto creado en el nervio ciático se empleó un autoinjerto nervioso (grupo A). En el segundo grupo se utilizó aloinjerto nervioso descelularizado liofilizado para tratar la lesión (grupo B). Para reparar el defecto en el tercer grupo, se utilizó aloinjerto nervioso descelularizado conservado en fresco (grupo C). Finalmente, en el cuarto grupo se utilizó un tubo de silicona para realizar la reparación (grupo D) y se consideró como grupo de control negativo.

A las 14 semanas se realizaron las pruebas funcionales a cada uno de los animales de experimentación de cada grupo y, en la semana 20, se sacrificaron para analizar la histología y la morfología del nervio ciático reparado, así como de los músculos de la extremidad trasera intervenida (derecha) en comparación con la extremidad trasera sana (izquierda) en todos los casos.

Tabla 1. Esquema del diseño experimental de los 4 grupos del estudio. De arriba a abajo: nombre del grupo, función del grupo, método de reparación y fuente u origen del método de reparación.

Nombre	Grupo A	Grupo B	Grupo C	Grupo D
Grupo	Control positivo	Experimental	Experimental	Control negativo
Injerto	Autoinjerto nervioso	Aloinjerto nervioso acelular liofilizado	Aloinjerto nervioso acelular fresco	Tubo de silicona
Fuente	Nervio ciático de rata autólogo	Nervio ciático de rata donante	Nervio ciático de rata donante	Catéter venoso periférico 20G

Ilustración 1. Esquema gráfico de la reparación del defecto de 14 mm del nervio ciático derecho en ratas según el grupo experimental. El degradado del segundo modelo representa la rotación de 180° del autoinjerto de nervio ciático. La izquierda de la imagen es la zona proximal.



/ ANIMALES

Se utilizaron 32 ratas Wistar (Wistar IGS Rat, Charles River), todas ellas hembra adultas de 190-280 g de peso y 2-4 meses de edad (proporcionadas por la Unidad de Bioterio e Imagen Preclínica de la Universidad de Oviedo) como sujetos del experimento.

/ JUSTIFICACIÓN DEL MODELO

Para elegir el modelo animal que más se adecuaba a nuestros objetivos se tuvo en cuenta las ventajas e inconvenientes de cada modelo disponible. Más del 90% de los artículos publicados sobre regeneración nerviosa están basados en un modelo animal

con ratas (37). Entre las ventajas del modelo está el mayor tamaño de las ratas frente a los ratones, facilitando la técnica microquirúrgica, la existencia de pruebas funcionales comparables y estandarizadas y la mayor capacidad de adaptación de las ratas frente a los ratones (38). Además, a nivel de microscopía óptica y electrónica, el nervio de las ratas es muy similar a los nervios humanos (39).

Por otro lado, se eligió el nervio ciático como nervio para llevar a cabo el experimento porque es el tipo de nervio más utilizado para evaluar la recuperación de la función motora, por lo que es más sencillo comparar los resultados obtenidos en el procedimiento con los presentados por otros investigadores que utilizaron el mismo modelo. Igualmente, el nervio ciático tiene un buen calibre, es fácilmente accesible y presenta pocas ramas colaterales proximales a su división en la rodilla, lo que favorece su elección (37).

Asimismo, el estudio se realizó con ratas hembras porque tienden a crecer menos, presentando una agresividad menor que la de los machos, haciendo más fácil su estabulación y disminuyendo el riesgo de autotomía que implican los experimentos en nervios periféricos. En esta misma línea, se sabe que las hormonas sexuales femeninas ejercen un marcado efecto neuroprotector que estimula la regeneración nerviosa (40,41). Finalmente, se ha visto que la recuperación tras lesiones de nervio periférico y las conclusiones que se obtienen son similares entre todas las cepas de rata utilizadas, por lo que se escogieron las ratas Wistar con las que los investigadores estaban más familiarizados (37,39).

/ ALOJAMIENTO Y CUIDADO DE ANIMALES

Para la experimentación animal se utilizaron las instalaciones de la Unidad de Bioterio e Imagen Preclínica de los Servicios Científico-Técnicos de la Universidad de Oviedo (Nº de registro: ES 33044 13A). Todos los experimentos fueron aprobados por el Comité Ético de Experimentación Animal de la Universidad de Oviedo (ver Anexos). Los animales se alojaron en jaulas de 3 en 3 desde la décima semana de vida, minimizando así los problemas de agresión que se pueden dar entre sujetos desconocidos, volviéndose a colocar de nuevo en la misma jaula al terminar la cirugía para beneficiarse de la memoria social (42). Las jaulas se nombraron mediante las letras del abecedario en orden de la A-Z, y, para poder identificar las 3 ratas dentro de cada

jaula, se realizó un marcaje en la oreja del animal (rata 1: ausencia de marcaje; rata 2: marcaje oreja derecha; rata 3: marcaje oreja izquierda) al finalizar la intervención y antes de despertarlos de la anestesia.

Todos los animales se conservaron en unas condiciones constantes de temperatura y humedad adecuadas, con ciclos de luz-oscuridad de 12/12 horas y con acceso *ad libitum* a alimento y agua. Se realizó seguimiento del bienestar del animal mediante monitorización estrecha cada 12 horas de la ingesta de alimento y agua, el dolor, el aspecto de las heridas, el estado de la extremidad intervenida y su actividad física. Este control se mantuvo durante la primera semana vigilando los parámetros dos veces al día y, posteriormente, una vez al día hasta proceder a la eutanasia de los animales según el protocolo vigente. Para evitar la aparición de escoriaciones o lesiones de cualquier otro tipo en la extremidad trasera derecha se colocó más viruta en las jaulas.

Todas las intervenciones quirúrgicas se realizaron bajo anestesia intraperitoneal con xilacina 5 mg/kg (Rompun®, Bayer Hispania S.L., Barcelona) y ketamina hidrocloruro 75 mg/kg (Imalgene®; Merial Laboratorios S.A., Barcelona) combinada con analgésicos como la buprenorfina 0,2-0,5 mg/kg (Bupaq®, Laboratorios Karizoo S.A., Barcelona) y el carprofeno 5-10 mg/kg (Rimadyl®, Zoetis Spain S.L., Madrid) administrados de forma subcutánea a las dosis recomendadas según peso. Se mantuvo la anestesia durante la intervención con inhalación continua de isoflurano 1,5% (Isoflo®, Esteve Veterinaria, Ciudad Real). Se administró profilaxis antibiótica con enrofloxacino 2.5% (Alsir®, Ecuphar Veterinaria S.L.U., Barcelona) a dosis de 5 mg/kg peso cada 12 horas por vía intraperitoneal 15 minutos antes de empezar la intervención y habiendo administrado ya los fármacos anestésicos. Para el tratamiento del dolor postoperatorio, se administró buprenorfina (dosis según peso) en el agua cada 12 horas junto con carprofeno (dosis según peso) cada 24 horas durante los primeros cinco días.

Los criterios de punto final definidos fueron: pérdida de peso mayor del 20%, dolor no controlable con analgesia habitual, mutilación de la extremidad intervenida y la presencia de úlceras y heridas que no mejoraban pese a las curas frecuentes.

El método escogido para la eutanasia fue la sobredosis anestésica con pentobarbital sódico 100 mg/kg (Dolethal, Vétoquinol E.V.S.A., Madrid) intracardiaco tras anestesia general de la rata con isoflurano 2%.

/ JUSTIFICACIÓN DEL TAMAÑO MUESTRAL

Para el cálculo del tamaño de la muestra hemos utilizado el análisis de la varianza (ANOVA). Teniendo en cuenta que el error alfa elegido es de 0,05 y el error beta de 0,20, la variable seleccionada es el número de axones presentes en el segmento distal al injerto. Sabiendo que se pretende detectar una diferencia mínima de 1000 axones, con desviación estándar de 500 axones a las 12 semanas, y estimando que haya un 15% de pérdidas, el número de ratas necesario al final del estudio sería de 8 por grupo (43).

/ PREPARACIÓN DEL INJERTO

Para la preparación de los aloinjertos del grupo B y C se extrajo el nervio ciático de ambas patas traseras de ratas Wistar de 200-350 g. Estos animales se utilizan normalmente en prácticas de microcirugía experimental en el Servicio de Cirugía Plástica del Hospital Universitario Central de Asturias y se aprovecharon una vez concluida la práctica.

El procedimiento se realizó bajo anestesia intraperitoneal mediante la administración de ketamina hidrocloreto 75 mg/kg (Imalgene®; Merial Laboratorios S.A., Barcelona) y xilacina 5 mg/kg (Rompun®, Bayer Hispania S.L., Barcelona) junto con analgesia subcutánea con carprofeno 5-10 mg/kg (Rimadyl®, Zoetis Spain S.L., Madrid) y buprenorfina 0,2-0,5 mg/kg (Bupaq®, Laboratorios Karizoo S.A., Barcelona). Habiéndose rasurado las extremidades traseras y en condiciones de antisepsia, se realizó una incisión desde el cóccix hasta el cóndilo femoral lateral exponiendo el bíceps femoral. Mediante disección roma se separó el bíceps femoral y el glúteo superficial para exponer el nervio ciático desde su orificio de salida hasta su trifurcación a nivel de la rodilla. Bajo microscopio quirúrgico y siempre realizado por el mismo cirujano (M.J.M.), se extrajo el injerto desde la zona inmediatamente distal a la salida de la rama para el bíceps femoral hasta los 5 mm proximales a la trifurcación del nervio a nivel de la rodilla. Este procedimiento se hizo en ambos lados. Normalmente, los injertos obtenidos alcanzaron los 20 mm. Una vez obtenidos, los injertos se sumergieron inmediatamente en un recipiente estéril con suero salino fisiológico (NaCl 0,9%, B. Braun, Barcelona) y se almacenaron a 4-8°C. Por último, se sacrificaron los animales

donantes mediante inyección intracardíaca de pentobarbital sódico 100 mg/kg (Dolethal, Vétoquinol E.V.S.A., Madrid).

/ PROTOCOLO DE DESCELULARIZACIÓN

En menos de 24 horas, los injertos se sometieron a un proceso de incubación con solución hipertónica 1 M de NaCl (Sigma Aldrich Inc.) y agitación media durante 24 horas. A continuación, se lavó la muestra con dodecilsulfato sódico (*sodium dodecyl sulfate*, SDS) (Sigma Aldrich Inc.) 0,1% y tampón fosfato salino (*phosphate-buffer saline*, PBS) (Thermo Fisher Scientific) 1x en agitación media constante durante 3 días. Los injertos obtenidos se destinaron a los dos grupos experimentales B y C variando el sistema de preservación. En el caso de los aloinjertos descelularizados conservados en fresco, se almacenaron en un recipiente estéril con suero salino (NaCl 0,9%, B. Braun, Barcelona) a 4°C tras finalizar el procesamiento. En el caso de los aloinjertos descelularizados liofilizados, se congelaron a -80°C durante 24 horas y, a continuación, se procedió a su liofilización (LyoQuest, Telstar®). Posteriormente, se conservaron en un bote estéril sin ninguna solución.

/ TÉCNICA QUIRÚRGICA

Las intervenciones se realizaron en el quirófano experimental de la Unidad de Bioterio e Imagen Preclínica de la Universidad de Oviedo en condiciones de asepsia.

La inducción anestésica se realizó mediante inyección intraperitoneal de ketamina hidrocloreto 75 mg/kg (Imalgene®; Merial Laboratorios S.A., Barcelona) y xilacina 5 mg/kg (Rompun®, Bayer Hispania S.L., Barcelona). Se utilizó la vía subcutánea con carprofeno 5-10 mg/kg (Rimadyl®, Zoetis Spain S.L., Madrid). y buprenorfina 0,2-0,5 mg/kg (Bupaq®, Laboratorios Karizoo S.A., Barcelona) y se mantuvo la anestesia durante el procedimiento con inhalación continua de isoflurano 1,5% (Isoflo®, Esteve Veterinaria, Ciudad Real). Se administró profilaxis antibiótica con enrofloxacino 2.5% (Alsir®, Eucuphar Veterinaria S.L.U., Barcelona) a dosis de 5 mg/kg peso cada 12 horas durante 1 día. Para preservar la normotermia del animal se utilizó una manta eléctrica colocada debajo del sujeto. Todos los procedimientos quirúrgicos

se realizaron bajo microscopio quirúrgico (Leica Microsystems GmbH) y por el mismo investigador (M.J.M.).

El material quirúrgico estéril utilizado para realizar las intervenciones viene descrito en la tabla 2.

Tabla 2. Material quirúrgico necesario para realizar la técnica quirúrgica.

Paño fenestrado.	Aguja subcutánea 16 mm.
Bisturí nº 15.	Ágrafes (Manipler® AZ, B. Braun España, Barcelona).
Seda 3-0.	Nylon 4-0 (Ethilon™, Ethicon, Somerville, NJ).
Tijeras de iris.	Polipropileno 10-0 (Prolene™, Ethicon, Somerville, NJ).
Pinzas de Adson con dientes.	Nylon 8-0 (Ethilon™, Ethicon, Somerville, NJ).
Portaagujas	Poliglactina 4-0 (Vicryl™, Ethicon, Somerville, NJ).
2 pinzas de relojero.	Gasas de hilo.
Tijeras curvas de microcirugía.	Jeringa 2 mL.
Portaagujas de Barraquer.	10 mL suero salino 0.9%.

El nervio ciático se forma de la unión de las raíces espinales correspondientes a los niveles L4-L6 y, posteriormente, se organiza en fascículos. Tras salir por el agujero ciático y entrar en la extremidad inferior, da las ramas para los extensores de cadera y flexores de la pierna y desciende por debajo del glúteo medio hacia el muslo. A nivel del

tercio medio del muslo se divide dando lugar al nervio tibial, el peroneo, el sural y el nervio cutáneo posterior. El nervio peroneo inerva al músculo tibial anterior y al extensor largo de los dedos y el nervio tibial a los flexores plantares (gastrocnemios), flexores de los dedos y tibial posterior (44). Topográficamente, el nervio ciático se localiza en el muslo entre el músculo glúteo superficial y el bíceps femoral (45,46).

Antes de comenzar la cirugía, se rasuró la extremidad trasera derecha y se colocó al animal en decúbito prono con las dos extremidades separadas en ángulo de 45-60°. Tras marcar la superficie a intervenir con povidona yodada 10% (Betadine® solución dérmica, VIATRIS Pharmaceuticals S.A.U., Madrid) y colocar el paño fenestrado, se realizó la incisión desde el cóccix hasta el cóndilo femoral lateral para localizar el bíceps femoral, que se debe separar cuidadosamente para evitar dañar el pedículo vascular. A continuación, se seccionó completamente el nervio ciático 5 mm proximal a su trifurcación y, tomando como referencia la aguja subcutánea, se cortó el nervio en su extremo proximal para obtener el segmento de 14 mm de nervio ciático necesario para crear el defecto nervioso. Se utilizó la aguja que mide 16 mm y se cortó el nervio justo por dentro de los límites de la misma. Esta primera parte de la técnica quirúrgica fue común para los cuatro grupos experimentales.

En los animales del grupo A, el defecto nervio se trató con un autoinjerto nervioso. Para ello se rotó 180° el segmento de nervio ciático obtenido al crear el defecto y se suturó proximal y distalmente con 4 puntos epineurales de polipropileno 10-0 (Prolene™, Ethicon, Somerville, NJ) en cada extremo.

En el grupo B (aloinjerto acelular liofilizado), el primer paso fue añadir suero salino fisiológico (NaCl 0.9%, B. Braun, Barcelona) al aloinjerto liofilizado para rehidratarlo (10 minutos). El defecto de nervio ciático se reparó con 14 mm del aloinjerto rehidratado suturado con 4 puntos epineurales de polipropileno 10-0 en cada extremo. En las ratas del grupo C (aloinjerto descelularizado fresco), una vez localizado el nervio ciático y creado el defecto de 14 mm, se abrió el recipiente estéril con el aloinjerto descelularizado conservado en fresco y se cortó a la medida de 14 mm, suturándose los extremos proximal y distal con 4 puntos epineurales de polipropileno 10-0 en cada uno.

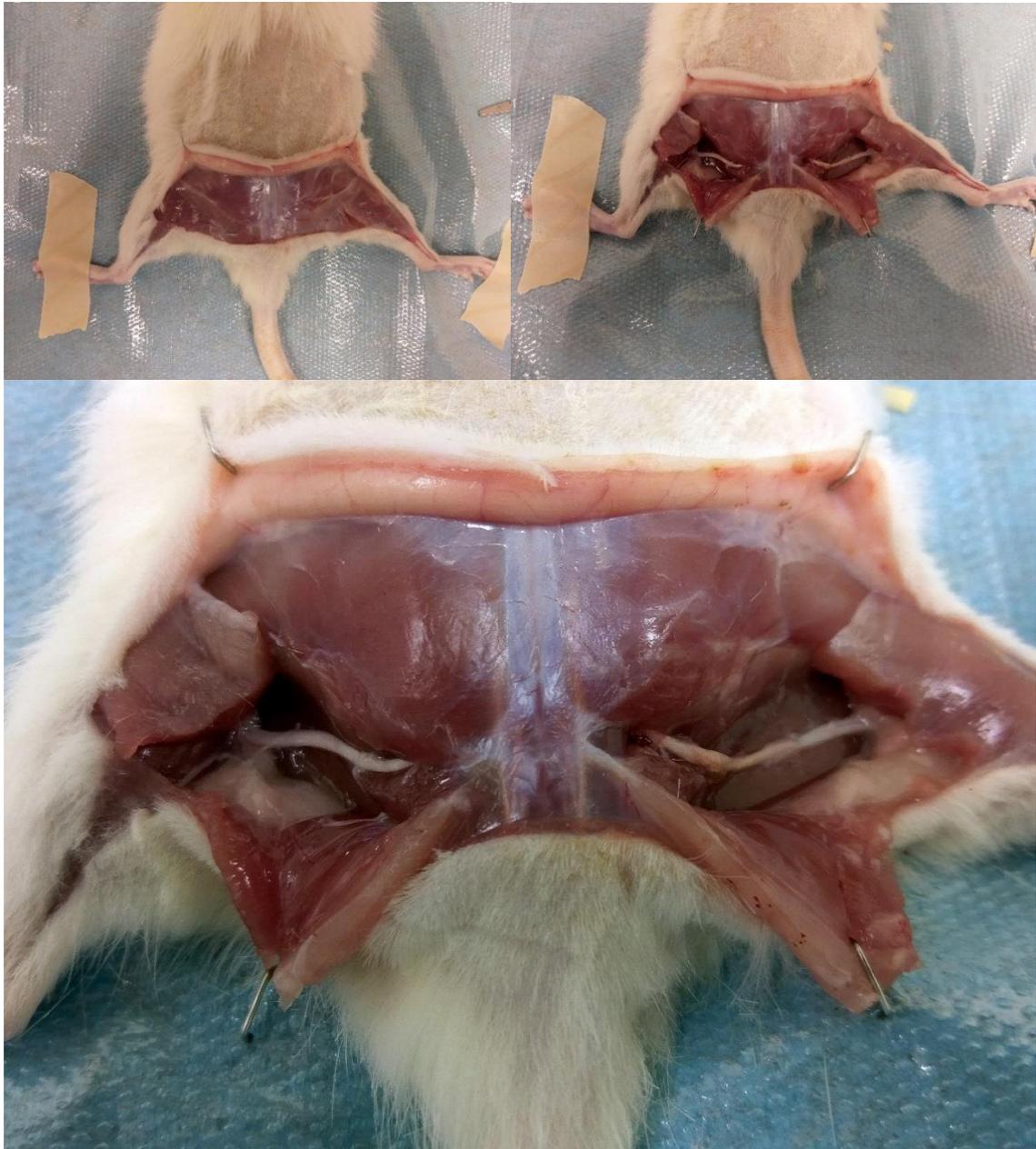
Finalmente, a los animales del grupo D, considerados como el grupo control negativo, se les reparó la lesión nerviosa interponiendo un tubo transparente de poliuretano certón (catéter intravenoso periférico 20GA, Introcán Safety®, Braun, Barcelona) de 14 mm suturado en los extremos proximal y distal con 4 puntos de nylon

8-0 (Ethilon™, Ethicon, Somerville, NJ). En este caso fue necesario utilizar una sutura más fuerte para que la aguja pudiera atravesar la pared del tubo.

En los cuatro grupos, una vez finalizada la sutura nerviosa o neurorrafia, se irrigó la zona con suero salino y se procedió al cierre de la fascia muscular y la piel con puntos sueltos invertidos de poliglactina 4-0 (Vicryl™, Ethicon, Somerville, NJ) y nylon 4-0 (Ethilon™, Ethicon, Somerville, NJ), respectivamente. Se reforzó la sutura cutánea con ágrafes. Antes de terminar, se realizó el marcaje en la oreja como método de identificación de los animales de experimentación en la jaula. Posteriormente, se envolvió a los animales en papel para mantenerlos calientes y que se recuperasen antes de regresar a la sala de mantenimiento convencional. Cada animal fue devuelto a su jaula original.

A las 20 semanas de la cirugía inicial, se volvió a anestésiar a las ratas mediante inhalación de isofluroano 2% y se procedió a la eutanasia de las mismas con inyección intracardiaca con pentobarbital a dosis de 100 mg/kg. Una vez sacrificada y en condiciones de esterilidad, se realizó una incisión desde el cóccix hasta el cóndilo femoral lateral y se procedió a extraer el nervio ciático completo de la extremidad derecha desde su salida del agujero ciático hasta su trifurcación en la rodilla. Asimismo, se obtuvo el nervio ciático intacto del lado izquierdo en toda su longitud. Ambos nervios se conservaron en recipientes individuales con paraformaldehído al 4%. Al mismo tiempo se extrajo el músculo tibial anterior y gastrocnemio medial de cada lado para poder pesarlos y analizarlos histológicamente. Todas las muestras se conservaron en recipientes individuales con paraformaldehído 4% (ilustración 1).

Ilustración 2. Fotografía del abordaje para la obtención de los nervios ciáticos de ambos lados y de los músculos en un animal del grupo C. En la primera imagen se observa la línea fascial entre glúteo superficial y bíceps femoral. En la segunda, nervio ciático expuesto en ambos lados tras sección y retracción de bíceps femoral. En la tercera, detalle de ambos nervios ciáticos.



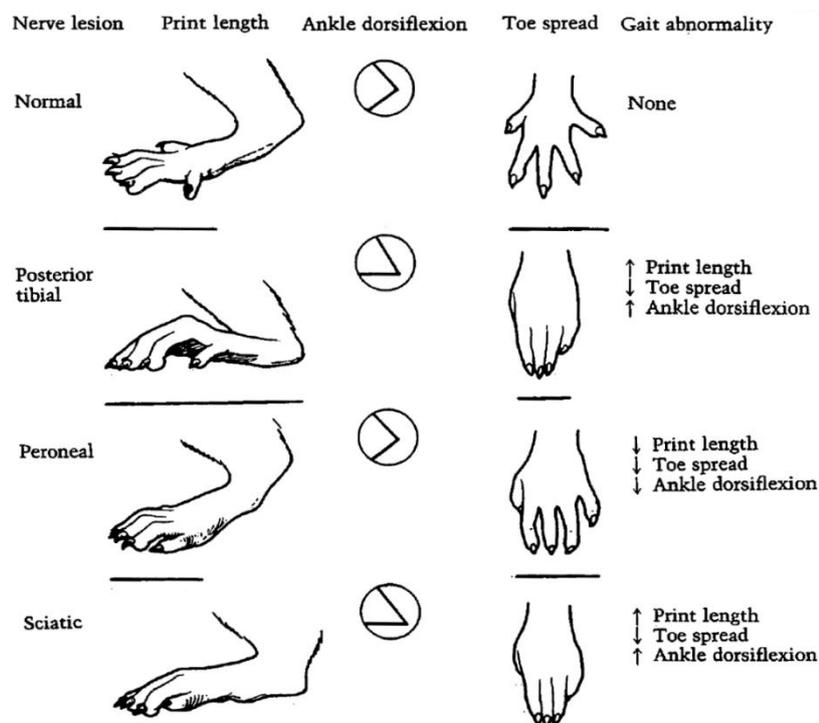
/ PRUEBAS FUNCIONALES

A las 14 semanas se evaluó la función motora mediante dos pruebas: los índices funcionales del nervio ciático, tibial y peroneo calculados tras analizar la pisada de la rata y el test del Rotarod.

/ ANÁLISIS DE LA PISADA

El análisis consiste en registrar y examinar la huella que dejan las patas traseras de la rata al caminar en línea recta. Se hizo caminar a la rata por un pasillo de 8,2 x 42 cm oscurecido al final y tapizado por un papel de filtro blanco (47,48). Para que quedaran marcadas las pisadas, se humedecieron las plantas de las patas traseras con colorante alimenticio: rojo para el lado derecho y azul para el izquierdo. Para aumentar la fiabilidad y consistencia del registro, se estableció como criterio de validez la presencia de 3 huellas consecutivas de la misma extremidad en línea recta y en la misma hoja en blanco. Se realizaron dos registros por cada rata. En casos en los que las huellas estaban poco definidas, emborronadas o fueran muy irregulares, se repitió la prueba hasta conseguir dos muestras válidas.

Ilustración 3. Cambios en la marcha asociados con lesiones selectivas del nervio tibial posterior, peroneo y ciático. Imagen tomada del artículo original firmado por Bain *et al.* 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.



Las medidas que se recogieron fueron:

- la distancia desde el dedo gordo de la extremidad de un lado hasta el dedo gordo de la extremidad del lado contrario; distancia a la extremidad contraria (*to the opposite foot*, TOF).
- la distancia desde el talón hasta el dedo gordo del mismo pie; longitud de la huella (*plantar length*, PL).
- la distancia entre el dedo gordo y el dedo pequeño; extensión del dedo gordo (*toe spread*, TS).
- la distancia entre el segundo dedo y el cuarto; extensión intermedia del dedo gordo (*intermediate toe spread*, IT).

Todas las medidas se tomaron tanto para el lado experimental (añadiendo la letra E a las siglas correspondientes a la medida) como para el lado no intervenido (añadiendo la letra N a las siglas de las medidas). NTOF se correspondería con la distancia desde el primer dedo del lado sano hasta el primer dedo del lado opuesto. Se tomó siempre el valor más alto de los dos registros obtenidos para cada una de las variables. En los casos en los que la distancia entre el primer y quinto dedo o entre el segundo y el cuarto no se pudieran medir, se les asignó un valor de 6 mm (48).

ÍNDICE FUNCIONAL DEL CIÁTICO (*Sciatic functional index*, SFI)

El índice funcional del ciático se calculó siguiendo la fórmula descrita previamente por Bain (48). El resultado se interpreta teniendo en cuenta un valor de -100% para los animales con sección del nervio ciático y con un valor de 0% para los animales sanos. Es técnicamente posible obtener un valor inferior a -100%, ya que en la fórmula hay varias constantes (49). Hay que tener en cuenta que la automutilación o la retracción muscular crónica pueden impedir su realización.

Ilustración 4. Fórmula para el cálculo del índice funcional del ciático descrita por Bain en 1989 resultante de una regresión lineal múltiple. EPL: *experimental print length*. NPL: *normal print length*. ETS: *experimental toe spread*. NTS: *normal toe spread*. EIT: *experimental intermediary toe spread*. NIT: *normal intermediary toe spread*.

-38,3(factor longitud huella) + 109,5(factor extensión dedo gordo) + 13,3(factor extensión intermedia dedo gordo) – 8,8

$$SFI = -38,3 \left(\frac{EPL - NPL}{NPL} \right) + 109,5 \left(\frac{ETS - NTS}{NTS} \right) + 13,3 \left(\frac{EIT - NIT}{NIT} \right) - 8,8$$

ÍNDICE FUNCIONAL DEL TIBIAL (*Tibial functional index*, SFI)

Utilizando las medidas del análisis de la pisada se calculó el índice funcional del nervio tibial mediante la fórmula obtenida mediante regresión lineal múltiple (48). El resultado se interpreta teniendo en cuenta un valor de -100% para los animales con sección del nervio ciático y con un valor de 0% para los animales sanos.

Ilustración 5. Fórmula para el cálculo del índice funcional del tibial descrita por Bain en 1989 resultante de una regresión lineal múltiple (12). EPL: *experimental print length*. NPL: *normal print length*. ETS: *experimental toe spread*. NTS: *normal toe spread*. EIT: *experimental intermediary toe spread*. NIT: *normal intermediary toe spread*.

-37,2(factor longitud huella) + 104,4(factor extensión dedo gordo) + 45,6(factor extensión intermedia dedo gordo) – 8,8

$$TFI = -37,2 \left(\frac{EPL - NPL}{NPL} \right) + 104,4 \left(\frac{ETS - NTS}{NTS} \right) + 45,6 \left(\frac{EIT - NIT}{NIT} \right) - 8,8$$

ÍNDICE FUNCIONAL DEL PERONEO (*Peroneal functional index*, SFI)

Utilizando las medidas del análisis de la pisada se calculó el índice funcional del nervio peroneo mediante la fórmula obtenida mediante regresión lineal múltiple (48). El resultado se interpreta teniendo en cuenta un valor de -100% para los animales con sección del nervio ciático y con un valor de 0% para los animales sanos.

Ilustración 6. Fórmula para el cálculo del índice funcional del tibial descrita por Bain en 1989 resultante de una regresión lineal múltiple (12). EPL: *experimental print length*. NPL: *normal print length*. ETS: *experimental toe spread*. NTS: *normal toe spread*.

$$174,9(\text{factor longitud huella}) + 80,3(\text{factor extensión dedo gordo}) - 13,4$$

$$PFI = 174,9 \left(\frac{EPL - NPL}{NPL} \right) + 80,3 \left(\frac{ETS - NTS}{NTS} \right) - 13,4$$

/ TEST DEL ROTAROD

El Rotarod es un dispositivo que consta de cuatro bovinas elevadas que giran en un eje común y que están separadas entre sí por paredes. La velocidad de rotación de las bovinas es ajustable, incluso se puede mantener constante o ir acelerando en un intervalo de tiempo. Asimismo, cuenta con una pantalla que registra la velocidad (revoluciones por minuto, rpm) y el tiempo (segundos, s) que lleva el animal rotando encima de cada una de las bovinas.

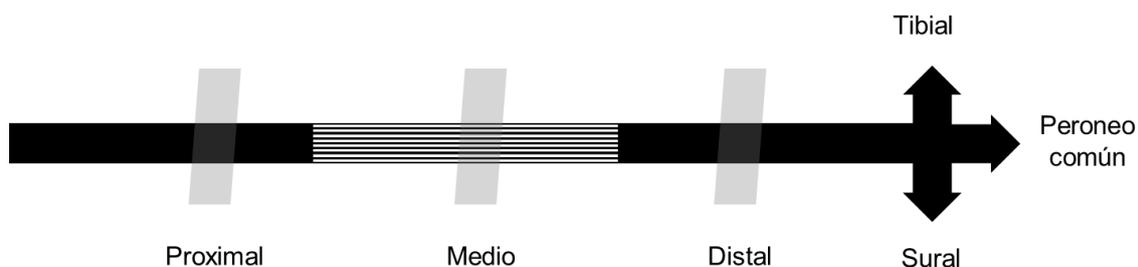
Se trata de una prueba muy sensible que analiza la coordinación motora midiendo el tiempo que aguanta el animal en una bovina desde el inicio de la rotación hasta que el animal cae en la tabla base (50).

La prueba realizada fue un test de aceleración de 4 rpm a 40 rpm en 10 minutos. La variable de resultado era la latencia (s), esto es, los segundos que duraba la rata rotando encima de la bovina hasta caerse y la velocidad (rpm) que llevaba el Rotarod en ese mismo momento. Se realizaron cuatro ensayos por rata en el mismo día espaciados 45 minutos entre sí. El día de antes a la prueba definitiva y a la misma hora, se les realizó un entrenamiento que consistió en que la rata se mantuviera a 4 rpm durante más de 60 segundos y, tras 30 minutos de descanso, debía mantenerse a 8 rpm durante 60 segundos más. Al día siguiente, se realizó la prueba definitiva con los 4 ensayos (*trials*) tal y como se ha descrito anteriormente.

/ HISTOMORFOLOGÍA DEL NERVIIO

El análisis histológico del nervio se realizó con muestras obtenidas en la semana 20 tras la cirugía inicial. Una vez extraídos los nervios, se colocaron en recipientes estériles con paraformaldehído (PFA) al 4% durante 12-24 horas. Después se postfijaron sumergiéndolos en tetróxido de osmio al 1% (Solución tetróxido de osmio 4% en agua, Sigma-Aldrich). En cada nervio del lado derecho (intervenido quirúrgicamente en todos los grupos) se realizaron tres cortes transversales: uno en el segmento proximal al injerto, otro en el punto medio del injerto y otro distal a la sutura distal del injerto (ilustración 6). Cada una de estas muestras se identificó como segmento proximal, medio o distal, respectivamente. A continuación, de cada uno de los cortes se extrajeron dos muestras: una para parafina y técnicas convencionales con hematoxilina de Harris (Merck) y otra para resinas y cortes semifinos de 1 μm realizados con el ultramicrotomo y teñidos con azul de toluidina al 1% (Tecnolab). De los nervios obtenidos del lado izquierdo (sano), se tomó una única muestra del tercio medio del nervio ciático del que se realizaron cortes convencionales con hematoxilina de Harris y semifinos para azul de toluidina al 1%.

Ilustración 7. Esquema del nervio ciático derecho de una rata. El segmento rayado se corresponde con el defecto nervioso de 14 mm reparado. En gris, los puntos en los que se toman las muestras para el segmento proximal (izquierda), medio (segmento rayado) y distal (derecha). Las flechas simbolizan la trifurcación terminal del ciático en nervio tibial, peroneo y sural.



MEDIDA DE LAS VARIABLES HISTOMORFOLÓGICAS DEL NERVIIO

Para recoger las variables de interés del análisis histomorfológico de los nervios se utilizó el software gratuito Fiji (51). Fiji es una versión más completa del programa ImageJ, un programa de procesamiento y análisis de imágenes de código abierto y dominio público realizado en lenguaje Java (52). Programas como Fiji permiten contar estructuras, medir el tamaño, la forma, la posición y otras propiedades presentes en las

imágenes de forma semiautomatizada (53). Para ello, se diseñó un método que consistía en lo siguiente:

- Digitalización de la imagen: hacer entendible una imagen al ordenador.
- Proceso de la imagen: conjunto de técnicas que hacen que la imagen final sea lo más adecuada posible para la siguiente tarea, resaltando zonas de interés, mejorando su aspecto, etc.
- Segmentación: convierte las imágenes en imágenes binarias en las que los objetos de interés tienen un valor determinado y el resto valor cero.
- Proceso de imagen binaria: conjunto de operaciones para corregir errores antes de la cuantificación.
- Cuantificación: medida de los objetos de interés.

Se desarrollaron una serie de órdenes secuenciales y automatizadas para ejecutarlas en Fiji. Esto es lo que se denomina macro (52). Para poder medir las distintas variables histomorfológicas se necesitan imágenes que puedan analizarse mediante dicho software.

Para la adquisición de imágenes se dispuso de un microscopio Olympus BX61 junto con el programa CAST (*The Computer Assisted Stereological Toolbox*, Olympus America Inc., Melville, NY). Se realizó un muestreo aleatorio del 25% del total de área nerviosa presente en cada muestra, generándose un número determinado de imágenes. En caso de que el número de imágenes resultante de ese muestreo fuera superior a 30, el área muestreada se redujo al 10%. Se seleccionó el área nerviosa total de la muestra con el objetivo de 4x y las imágenes se tomaron con el objetivo 100x y aceite de inmersión para producir una imagen digital final con 1000 aumentos y un tamaño de píxel de 0,064 μm . La resolución de cada imagen fue de 1360 x 1024 píxeles.

Una vez obtenidas las imágenes, se inició el programa Fiji y se abrió la macro diseñada para el estudio. Se debe seleccionar la carpeta con todas las imágenes correspondientes a un segmento del nervio ciático de una rata (por ejemplo, rata A3D: jaula A, rata marcaje oreja izquierda, segmento distal) y, al activar la macro, se producen una serie de órdenes que culminan en la medición y registro de las variables en forma de fichero .xlsx (Microsoft Excel, Microsoft Office 2016) (tabla 3).

Tabla 3. Ejemplo de fichero .xlsx tras el análisis de un segmento de nervio ciático de rata. El muestreo del segmento habría obtenido 9 imágenes cuya área representa el 25% del área total del segmento de nervio analizado.

Nombre de la imagen	Área de la imagen (μm^2)	Nº axones	Diámetro mínimo axón (μm)	Área media axones (μm^2)	Espesor medio de vaina de mielina (μm)	Desviación estándar espesor medio vaina mielina (μm)
Imagen01	5704,2534					
Imagen02	5704,2534					
Imagen03	5704,2534					
Imagen04	5704,2534					
Imagen05	5704,2534					
Imagen06	5704,2534					
Imagen07	5704,2534					
Imagen08	5704,2534					
Imagen09	5704,2534					
TOTAL	39929,7738					

El primer paso tras activar la macro consistió en seleccionar el umbral de detección. El programa selecciona un umbral de forma automática y ofrece la posibilidad de modificarlo en el momento viendo en dos ventanas separadas la imagen original y la imagen dinámica con el umbral aplicado. Así pues, para cada foto analizada, el investigador principal (M.J.M.) ajustó manualmente el umbral bajo el que la mayoría de las estructuras oscuras (mielina) quedaban incluidas. Los valores para dichos píxeles son inferiores a los del umbral y por ello quedan resaltados en rojo en el primer plano binario (*binary bitplane*).

Posteriormente, mediante una serie de acciones se midieron todas las variables histológicas que el programa es capaz de calcular (tabla 4): área de la imagen (μm^2), número de axones, diámetro mínimo y máximo del axón (μm), área media de los axones (μm^2), espesor medio de la vaina de mielina (μm), espesor máximo y mínimo de la vaina de mielina (μm) y desviación estándar del espesor medio de la vaina de mielina (μm). Para evitar la sobreestimación en el número de fibras, sólo se contaron como fibras nerviosas aquellas que estuvieran completas en la imagen y aquellas fibras incompletas que estuvieran en contacto con el borde izquierdo y el superior, no contando las fibras parciales que tocaban el lado inferior y el derecho de la imagen. Asimismo, en caso de que el programa no detectase automáticamente fibras o detectase estructuras que no lo eran, se corrigieron manualmente los errores.

Tabla 4. Variables histomorfológicas del nervio registradas. Sombreadas en gris, las variables obtenidas de forma semiautomatizada del programa Fiji.

Ítem	Definición
Área 25% (%)	Porcentaje de nervio muestreado.
Área 25% (μm^2)	Área nerviosa muestreada. Resulta de la suma del área de todas las imágenes obtenidas para un determinado segmento nervioso.
Área (μm^2)	Cálculo del área total del nervio multiplicando el área muestreada por 100/porcentaje muestreado (μm^2).
Nº axones	Número de axones recontados en todas las imágenes obtenidas para un mismo segmento nervioso.
Nº axones totales	Número de axones en todas las imágenes obtenidas para un mismo segmento nervioso multiplicado por 100/porcentaje muestreado para calcular el número de axones en toda la sección del nervio.
Densidad de fibras nerviosas (nº axones/ mm^2)	Cociente entre el número total de axones y el área nerviosa total en mm^2 .
Densidad de fibras nerviosas (número de axones/100 μm^2)	Cociente entre el número total de axones y el área nerviosa total en μm^2 multiplicado por 100.
Nº axones totales normalizado	Tomando como valor normal un área nerviosa de 0,25 mm^2 , se multiplica la densidad de fibras nerviosas (nº axones/ mm^2) para saber el número de axones totales que tendríamos si todas las muestras analizadas tuvieran la misma área.
Diámetro del axón (μm)	Se corresponde con el diámetro mínimo medido, excluyendo la vaina de mielina.
Área media del axón (μm^2)	Es la media de las áreas de los axones contenidos en una determinada imagen.
Espesor medio de la vaina de mielina (μm)	Es la media del espesor de la vaina de mielina de todos los axones contabilizados.
Desviación estándar del espesor de la capa de mielina (μm)	Desviación estándar de la media del espesor de la vaina de mielina.
Porcentaje de tejido nervioso (%)	Cociente entre el área nerviosa y el área del fascículo nervioso multiplicado por 100. Para calcular el área nerviosa multiplicamos el número total de axones por el área media de los axones.
Índice de regeneración	Cociente entre el número de axones normalizados presentes en el segmento distal y el número de axones normalizados del segmento proximal del mismo nervio

Ilustración 8. A la izquierda, corte semifino teñido con azul de toluidina a 1000 aumentos. La imagen original digitalizada y en la derecha, la imagen una vez aplicado el umbral de segmentación por defecto que tiene el programa. Abajo, el umbral de segmentación ajustado manualmente a demanda. En rojo, la vaina de mielina de las fibras.

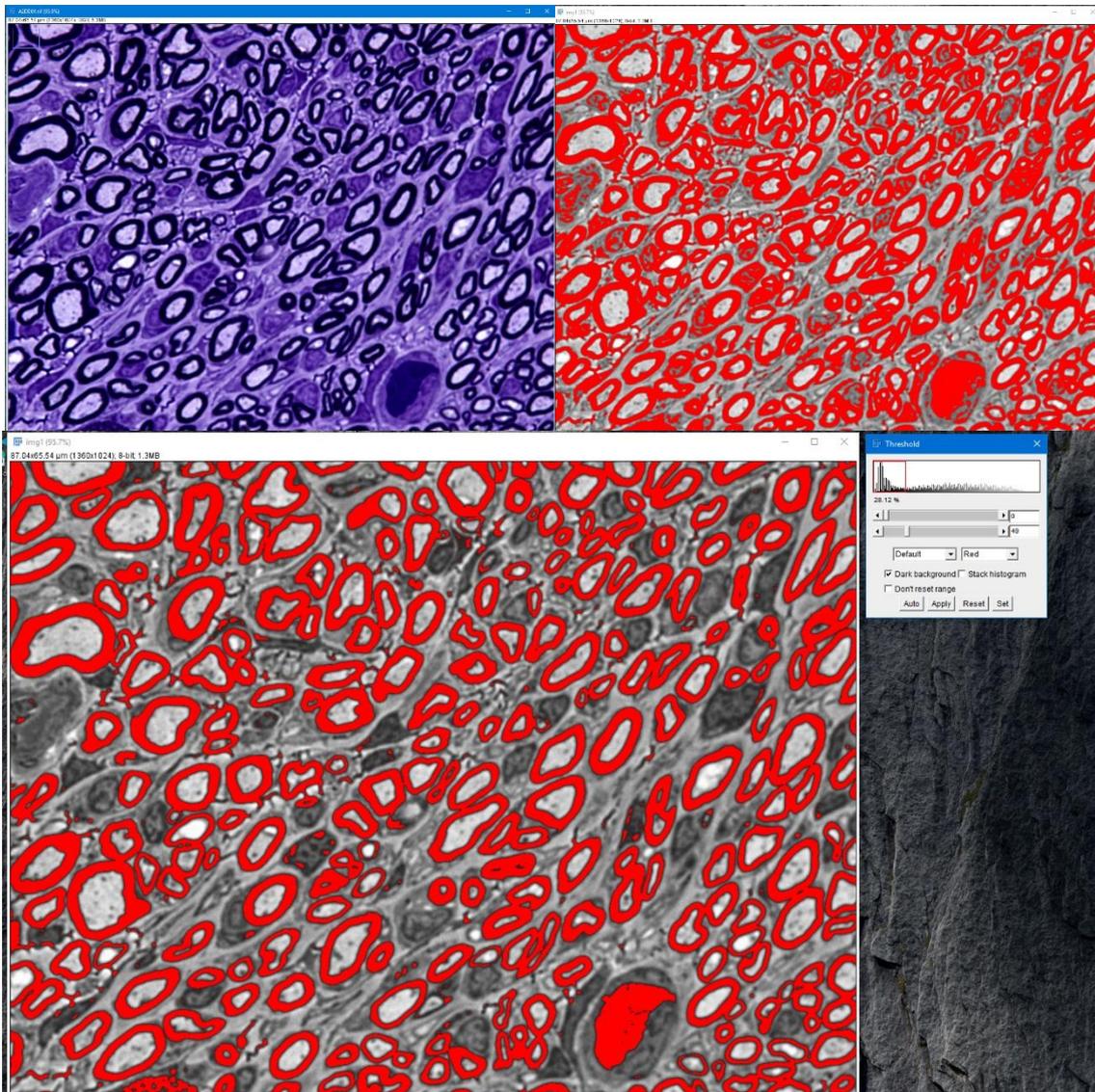
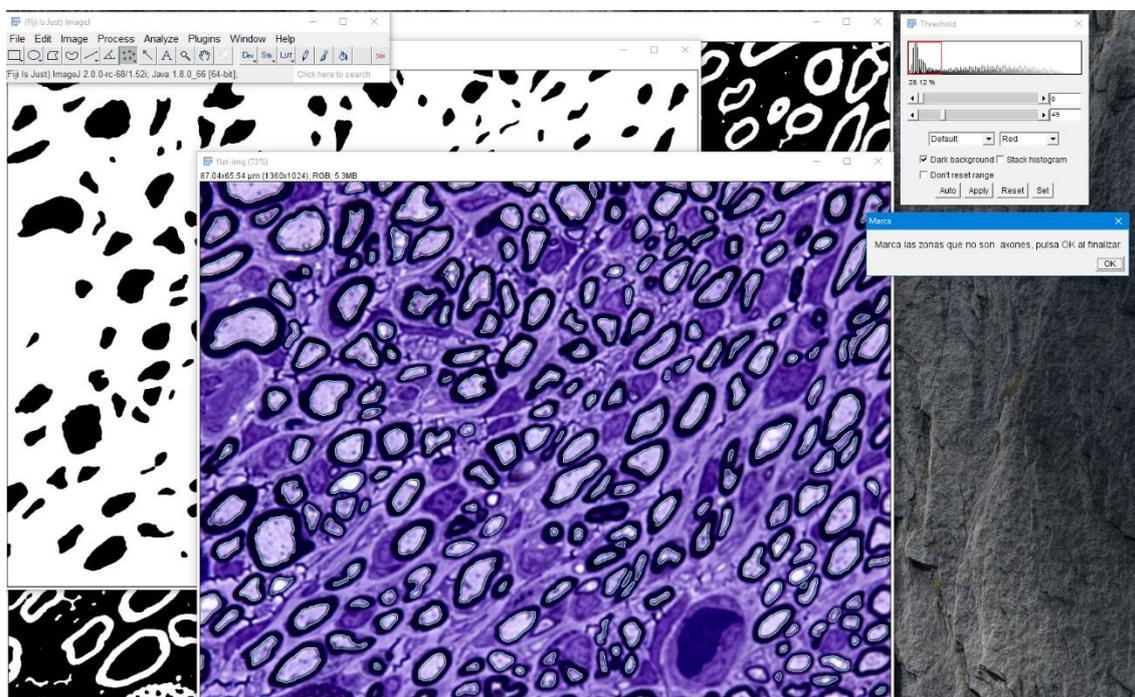


Ilustración 9. Corte semifino de segmento distal de rata teñido con azul de toluidina 1% a 1000 aumentos. Resaltado en verde aparece el contorno del axón. Nótese como las fibras que intersectan el borde inferior y el derecho no están marcadas ni se contabilizan.



DESCRIPCIÓN Y CÁLCULO DE LAS VARIABLES HISTOLÓGICAS

Número de axones (números enteros) (19,54): El número de axones resultante de la medición realizada por el programa en Fiji corresponde con el porcentaje de área nerviosa muestreada (25% o 10%). Para poder estimar el número total de axones en un determinado segmento nervioso se multiplica el número de axones por 4 (si se muestreó el 25%) o por 10 (si se muestreó el 10%).

Número de axones normalizados (números enteros): Puesto que cada segmento nervioso tiene un tamaño y calibre diferente, es necesario establecer un área de referencia sobre la que calcular el número de axones en todos los segmentos y poder realizar comparaciones. Si se hace la media del área nerviosa de todos los segmentos distales medidos, el valor es de $0,26 \pm 0,20 \text{ mm}^2$ (rango $0,046 - 0,74 \text{ mm}^2$). Para simplificar los cálculos se seleccionó $0,25 \text{ mm}^2$ como valor estándar y se multiplicó la densidad de fibras nerviosas por 0,25 para obtener el número de axones totales normalizado. El objetivo de esta medida es poder comparar estos resultados con estudios que no comunican la densidad de fibras nerviosas, el área del nervio medido u otras variables, pero sí el número total de fibras nerviosas.

Diámetro del axón (μm): corresponde al diámetro menor posible, excluyendo la vaina de mielina. Se obtuvo directamente del programa Fiji bajo el título de diámetro mínimo del axón.

Área del axón (μm^2): es la media de las áreas de los axones contenidos en una determinada imagen.

Espesor de la capa de mielina (μm): se corresponde con el ítem espesor medio de la vaina de mielina y es la media del espesor de la vaina de mielina de todos los axones contabilizados.

Desviación estándar del espesor de la capa de mielina (μm): desviación estándar de la media del espesor de la vaina de mielina.

Porcentaje de tejido nervioso (%): cociente entre el área nerviosa y el área del fascículo nervioso multiplicado por 100. Para calcular el área nerviosa multiplicamos el número total de axones por el área media de los axones. Para calcular el área intrafascicular, hay que sumar todas las áreas de las fotos muestreadas y multiplicarlas por 4 o 10 (según el porcentaje de área muestreada) para hallar el área total del nervio. El área de una imagen es siempre la misma: 1360×1024 píxeles (1 píxel = $0,064 \mu\text{m}$). Por tanto, cada imagen tiene un área de $1360 \text{ p} \times 0,064 \times 1024 \text{ p} \times 0,064 = 5.704,25344 \mu\text{m}^2$.

Índice de regeneración: cociente entre el número de axones normalizados presentes en el segmento distal y el número de axones normalizados del segmento proximal del mismo nervio (55).

Densidad de fibras nerviosas (número de axones/ mm^2): cociente entre el número total de axones y el área nerviosa total en mm^2 . Para calcular el área completa del nervio se suman las áreas de todas las imágenes tomadas en un segmento nervioso (distal, medio, proximal) y se multiplican por 4 o por 10 para obtener el área total. Después, se pasan de micras cuadradas a milímetros cuadrados.

Densidad de fibras nerviosas (número de axones/ $100 \mu\text{m}^2$): cociente entre el número total de axones y el área nerviosa total en μm^2 multiplicado por 100. Para calcular el área completa del nervio se suman las áreas (μm^2) de todas las imágenes tomadas en un segmento nervioso (distal, medio, proximal) y se multiplican por 4 o por

10 para obtener el área total. Otra alternativa es calcularlo a partir de la densidad de fibras nerviosas en número de axones/mm², multiplicando la cifra por 10⁻⁴.

/ HISTOMORFOLOGÍA MUSCULAR

El análisis histológico y la medida del peso de los músculos reinervados se realizó con muestras obtenidas en la semana 20. Una vez extraídos los nervios en las condiciones anteriormente descritas, se extrajeron los músculos gastrocnemio medial y tibial anterior de ambos lados. Se recogieron las siguientes variables:

PESO MUSCULAR

La masa muscular se correlaciona con la inervación muscular. Nada más extraer los músculos de la rata, se pesaron por separado en una balanza (Balanza de precisión PL1502E, Mettler-Toledo S.A.E.). El cociente entre el peso del músculo del lado derecho (experimental) y el músculo del lado izquierdo (sano) multiplicado por 100 informa del grado de atrofia muscular, siendo 0% el mayor grado de atrofia y 100% el músculo normal.

VALORACIÓN HISTOLÓGICA DEL MÚSCULO GASTROCNEMIO MEDIAL

Una vez pesados los músculos, se conservó el gastrocnemio medial derecho de todos los animales y el izquierdo de 16 ratas (seleccionadas aleatoriamente) en recipientes con PFA al 4%. Posteriormente, se cortaron y tiñeron con tricrómico de Gomori (Verde Luz de BIO-Óptica, Cromotrope 2R de Merck, ácido fosfotungstico de Sigma-Aldrich, solución de Bouin de Sigma-Aldrich y ácido acético glacial de Merck).

Se elaboró una clasificación basada en cuatro características de la muestra de músculo analizada: la atrofia de las fibras musculares en función del diámetro de las fibras (μm), la presencia de núcleos centrales, el depósito de colágeno (cuantificado con la tinción de tricrómico de Gomori) y el grado de infiltración grasa. Para determinar el umbral de diámetro de fibras según el cual se pueden clasificar las fibras musculares se utilizaron los valores aportados por los animales control (sanos). Las fibras con menor diámetro de estos animales marcaron el límite de la normalidad por debajo del cual se

consideraron al resto de las fibras musculares como atróficas. Este sistema de clasificación otorga 0 puntos si la variable no está presente, 1 punto si la característica implicada afecta al 50% o menos del tejido estudiado y, 2 puntos si se afecta o está presente en más del 50% del tejido estudiado. La puntuación final resulta de la suma de cada uno de los 4 valores, con un mínimo de 0 y un máximo de 8 puntos. De tal forma, se caracterizó la afectación muscular como leve (1 a 2 puntos), moderada (3 a 5 puntos) o grave/severa (6 a 8 puntos).

Tabla 5. Sistema de clasificación histológica del músculo.

	≤50% tejido estudiado	>50% tejido estudiado
Atrofia (diámetro de las fibras)	1 punto	2 puntos
Núcleos centrales	1 punto	2 puntos
Depósito de colágeno	1 punto	2 puntos
Infiltración grasa	1 punto	2 puntos
Puntuación final (0 a 8)	Lesión leve: 0 a 2 Lesión moderada: 3 a 5 Lesión severa: 6 a 8	

/ ESTADÍSTICA

Las variables cuantitativas analizadas se presentaron utilizando la media, la mediana, la desviación estándar, el valor mínimo y el máximo. También se indicó el número N de valores en cada análisis, ya que en algunas ocasiones puede ser inferior al tamaño muestral debido a valores perdidos. Las variables cualitativas se expresaron mediante las frecuencias absolutas y relativas para cada grupo (A-D).

Lo que ocurre es que tus tamaños muestrales son demasiado pequeño para acreditar si se desvían excesivamente de una distribución normal, por lo que no tiene sentido hacer estas pruebas, y por prudencia no hemos asumido normalidad

Las variables cuantitativas en cada uno de los grupos se presentan con media y desviación estándar en caso de presentar distribución normal o con mediana y rango

intercuartílico en caso contrario. Las variables cualitativas se presentan según su distribución de frecuencias.

Dado que los tamaños muestrales eran demasiado pequeños para acreditar si se desviaban de una distribución normal, y no tenía sentido hacer las pruebas para acreditarlo, por prudencia no se ha asumido normalidad. Para cada una de las variables se ha llevado a cabo la prueba de Kruskal-Wallis, para contrastar si las muestras de los diferentes grupos proceden de una misma población. Se trata de una prueba no paramétrica basada en los rangos de los valores. Se indica para cada prueba la significancia (p-valor), así como el tamaño muestral (N) y el rango medio de cada grupo. Las diferencias entre los grupos tienen su reflejo en la variabilidad de los rangos medios (que en caso de ausencia de diferencias entre grupos solo variarán aleatoriamente). Cuanto más pequeño el p-valor, mayor evidencia hay de que existen diferencias entre los grupos.

Se han elaborado diagramas de cajas para aquellas variables con p-valor $<0,1$, excepto en el caso del peso inicial, que se incluye para demostrar gráficamente la ausencia de diferencias marcadas entre los grupos. En las cajas, la línea horizontal representa la mediana y la X la media.

Dado que se trata de 35 contrastes de hipótesis, (no contando el del peso inicial, donde precisamente se pretende evidenciar la ausencia de diferencias pronunciadas entre los grupos), también se ha llevado a cabo un ajuste para contrastes múltiples según el método de Holm-Bonferroni.

Para las variables que presentaron diferencias significativas con el ajuste de Holm-Bonferroni, se realizó la prueba de Mann-Whitney para todos los pares de grupos posibles con el fin de averiguar entre qué grupos se daban las diferencias. Se indica para cada prueba la significancia (p-valor) obtenido en la prueba, así como el tamaño muestral y el rango medio de cada uno de los dos grupos. Cuanto más pequeño el p-valor, mayor evidencia hay de que existen diferencias entre los grupos. Dado que existen seis posibles emparejamientos de grupos (A-B, A-C, A-D, B-C, B-D, C-D), para cada variable se ha llevado a cabo nuevamente el ajuste de Holm-Bonferroni, esta vez para seis contrastes.

4/ RESULTADOS

/ ANIMALES

/ ALOJAMIENTO Y CUIDADO DE ANIMALES

/ PROTOCOLO DE DESCELULARIZACIÓN

/ TÉCNICA QUIRÚRGICA

/ PRUEBAS FUNCIONALES

/ HISTOMORFOLOGÍA DEL NERVIOS

/ HISTOMORFOLOGÍA MUSCULAR

4/ RESULTADOS

/ ANIMALES

De los 32 animales de experimentación distribuidos en los cuatro grupos experimentales e intervenidos quirúrgicamente según el protocolo descrito previamente, sobrevivieron a la fase experimental un total de 27 animales. Se produjo una pérdida de 5 animales: tres murieron dentro de las primeras 24 horas por causas desconocidas (2 del grupo D y 1 del grupo B), uno sufrió lesiones en la extremidad por canibalismo (grupo D) y el otro una dehiscencia no reparable de la sutura (grupo A) al día siguiente de la intervención (ilustración 9). En estos casos irreversibles se aplicaron los criterios de punto final, procediendo a la eutanasia de los animales implicados.

Ilustración 10. Fotografía tomada 24 horas después de la intervención. Se observa dehiscencia completa de la sutura muscular con exposición del nervio ciático reparado y autotomía en extremidad trasera derecha. Se procedió a la eutanasia del animal.



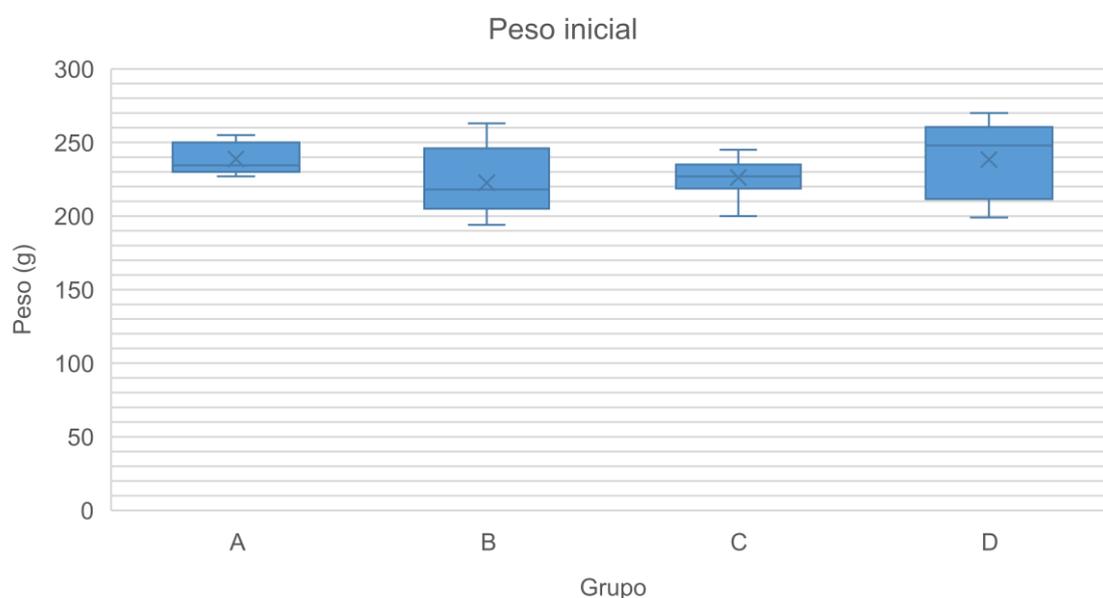
Puesto que lo que se pretendía era comparar todos los grupos con el control positivo, se decidió utilizar un animal más para el grupo A, por lo que el total de animales empleados fue de 33 con 5 pérdidas (15%) y un total de 28 animales vivos en la semana 20. Finalmente, los grupos quedaron con 8 animales en el grupo A, 7 en el grupo B, 8 en el C y 5 en el grupo D.

El incremento progresivo del peso de los animales de experimentación con el paso del tiempo es un indicador clásico de bienestar animal. Se calculó el incremento de peso de los animales desde la semana 0 hasta la semana 20 (ganancia de peso). En la tabla 6 y en el diagrama de cajas se puede observar la ausencia de diferencias marcadas en el peso inicial en cada uno de los grupos (gráfico 1). Asimismo, los animales de todos los grupos incrementaron su peso a lo largo del experimento, sin diferencias entre ellos.

Tabla 6. Peso inicial y ganancia de peso desde el primer día de la cirugía hasta la semana 20 (gramos) en cada grupo experimental.

Grupo (n)	Peso inicial (g)		Ganancia de peso (g)	
	Mediana	Rango	Mediana	Rango
A (8)	234,50	227,00 – 255,00	44,60	29,80 – 84,00
B (7)	218,00	194,00 – 263,00	61,00	35,00 – 84,00
C (8)	227,00	200,00 – 245,00	60,50	43,00 – 82,00
D (5)	248,00	299,00 – 270,00	37,00	3,70 – 86,00

Gráfico 1. Diagrama de cajas que representa el peso inicial (gramos) de los animales de cada grupo antes de comenzar la cirugía inicial.



DESCRIPCIÓN MACROSCÓPICA DE LOS ANIMALES

En la semana 20 post-intervención se pudo apreciar la correcta cicatrización cutánea en la zona previamente intervenida, prácticamente imperceptible a simple vista, así como el completo crecimiento del pelo.

En la descripción macroscópica de los animales en la semana 20 cabe destacar un descenso de volumen generalizado en la extremidad trasera derecha con respecto a la extremidad izquierda. Esta diferencia era más acusada en los animales de los grupos B, C y D que en el A (ilustraciones 10-14). En cuanto a la diferencia entre las extremidades derechas de cada grupo a simple vista, los animales del grupo D mostraron menor volumen muscular en la extremidad intervenida. En el detalle de la extremidad trasera derecha del grupo D se pudo constatar una actitud en flexión dorsal, con predominio de la musculatura del compartimento anterior (tibial anterior, *extensor digitorum longus*) frente a los flexores plantares (ilustración 15).

Ilustración 11. Fotografía de animales B2 y E3 del grupo A (control positivo) en decúbito prono en la semana 20 antes de la obtención de las muestras de nervio y músculo.



Ilustración 12. Detalle de la planta del pie derecho en animales del grupo A en la semana 20. Destaca la actitud en garra de todos los dedos.



Ilustración 13. Fotografía de animales D1 (izquierda) y D2 (derecha) del grupo B (aloinjerto acelular liofilizado) en decúbito prono en la semana 20 antes de la obtención de las muestras de nervio y músculo.



Ilustración 14. Fotografía del animal K2 del grupo C (aloinjerto acelular fresco) en decúbito prono en la semana 20 antes de la obtención de las muestras de nervio y músculo. A la derecha, detalle de las extremidades traseras.

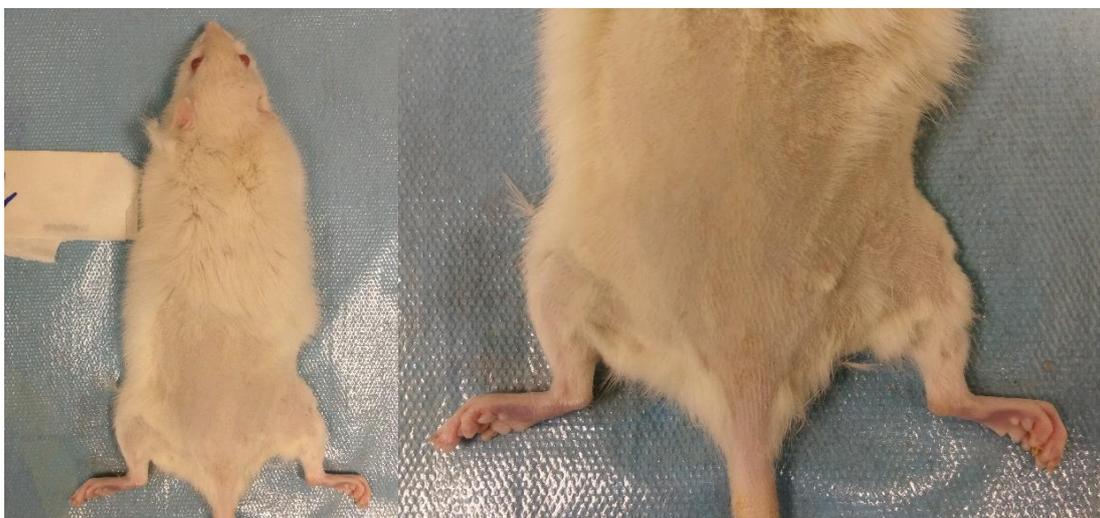


Ilustración 15. Fotografía de animales C2 (izquierda) y D3 (derecha) del grupo D (control negativo) en decúbito prono en la semana 20 antes de la obtención de las muestras de nervio y músculo.



Ilustración 16. Fotografía detallada de las extremidades traseras del animal D3 (grupo D).



/ ALOJAMIENTO Y CUIDADO DE ANIMALES

Tras realizar las primeras 3 intervenciones quirúrgicas se pudo evidenciar la necesidad de incrementar la fuerza de la sutura cutánea con ágrafes para evitar que los animales royeran los puntos de sutura de la piel y se abrieran las heridas. Junto con eso, se incrementó la analgesia añadiendo analgésicos en el agua de la jaula (definido

en la sección “Alojamiento y cuidado de los animales” del apartado de Material y Métodos). En los tres primeros casos en los se produjo una dehiscencia de la herida quirúrgica, esta se limpió y reparó en las primeras 24 horas tras la intervención (ilustración 8). En ningún caso quedó expuesto el nervio ciático reparado ni se evidenciaron signos de infección. En uno de los animales, la dehiscencia de la herida quirúrgica no permitió una reparación con garantías y se aplicaron los criterios de punto final.

En un caso se observó una lesión en el talón de la extremidad derecha de un animal del grupo B, no ulcerada y de crecimiento lento, que se desarrolló en las semanas previas a la semana 20, por lo que no impidió la realización de las pruebas funcionales (semana 14) (ilustración 9).El análisis histológico informó de lesión mal delimitada, identificándose zonas de epidermis conservada y otras con extensa ulceración de la piel y tejido de granulación subyacente, presentado focos de tejido óseo maduro compatible con metaplasia ósea.

Ilustración 17. Fotografía tomada 24 horas después de la intervención inicial. Se observa dehiscencia de herida quirúrgica que no expone nervio ciático. Se procedió a su limpieza y cierre de nuevo.



Ilustración 18. Fotografía en la semana 20 del animal del grupo B en decúbito prono en la que se observa tumoración en la planta de la extremidad trasera derecha.



/ PROTOCOLO DE DESCELULARIZACIÓN

Para evaluar la correcta descelularización de los aloinjertos se realizaron controles histológicos con técnicas de tinción con hematoxilina-eosina y con DAPI (4',6-diamidino-2-fenilindol), observándose ausencia de celularidad en las muestras tras realizar el protocolo de descelularización. Asimismo, también se pueden observar las imágenes con microscopía electrónica de barrido en las que se confirma la ausencia de células en el injerto nervioso obtenido.

Ilustración 19. Corte longitudinal de nervio ciático sano de rata control teñido con hematoxilina-eosina visto a microscopía óptica con magnificación 100x.

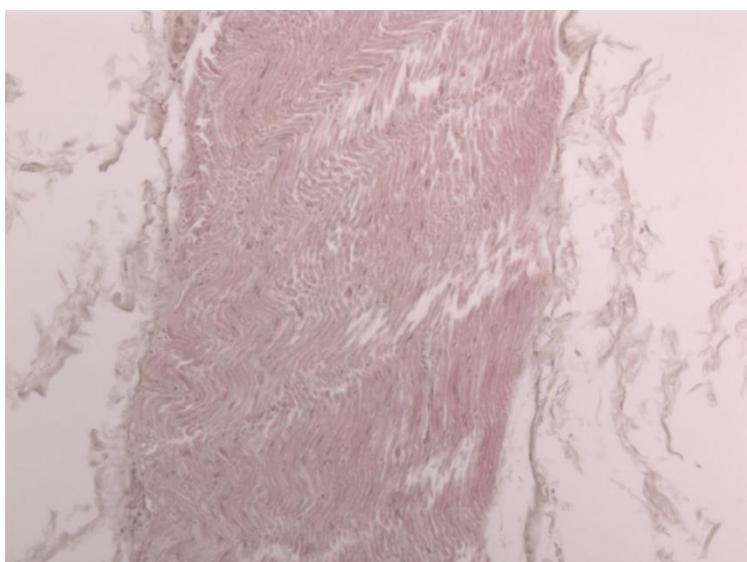


Ilustración 20. Corte transversal de nervio ciático sano de rata control teñido con hematoxilina-eosina visto a microscopía óptica con magnificación 100x.

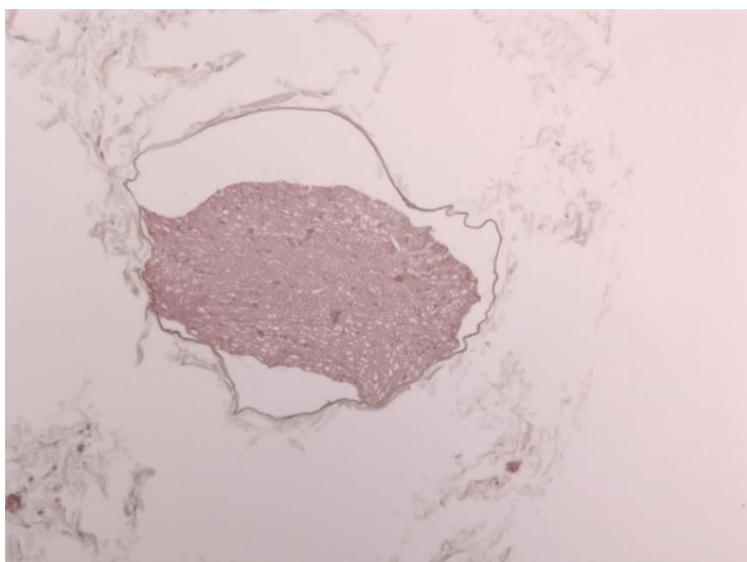


Ilustración 21. Corte longitudinal de nervio ciático sano de rata normal teñido con DAPI visto con microscopia de fluorescencia y magnificación 100x.

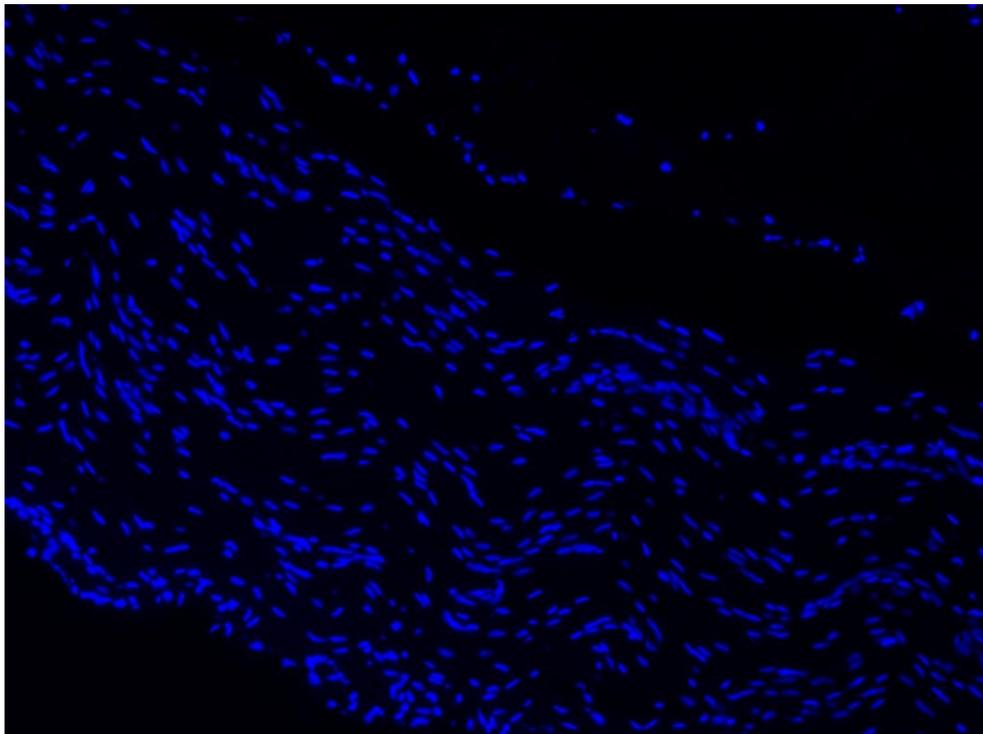


Ilustración 22. Corte transversal de nervio ciático sano de rata normal teñido con DAPI visto con microscopia de fluorescencia y magnificación de 100x.

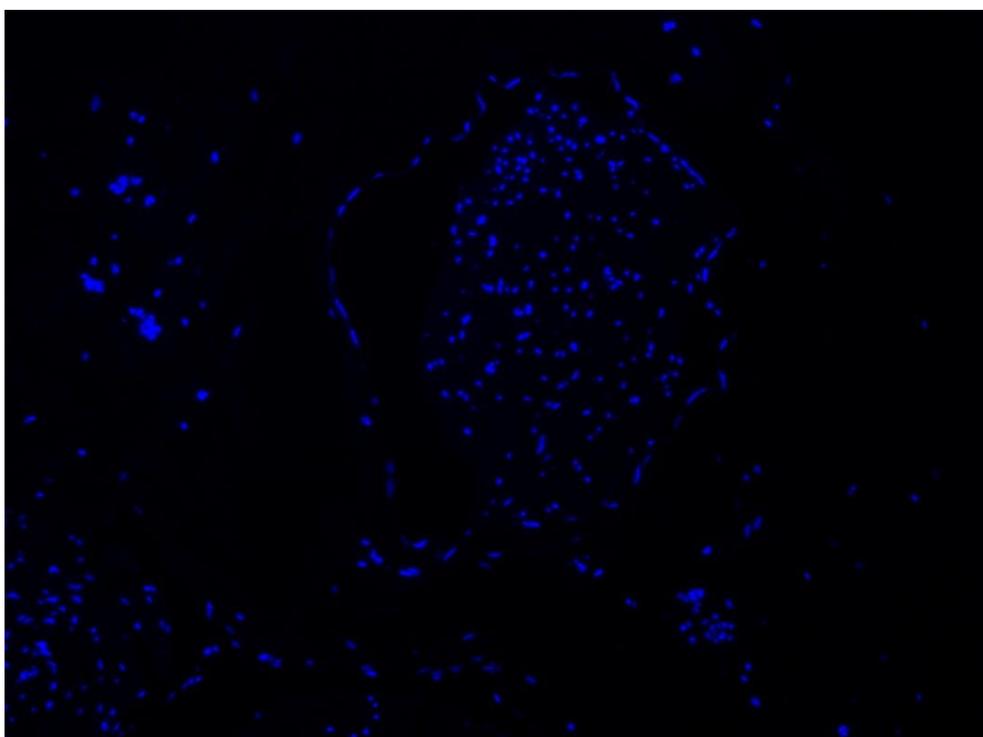


Ilustración 23. Corte longitudinal (izquierda) y transversal (derecha) de nervio ciático sano de rata control teñido con hematoxilina-eosina visto a microscopía óptica con magnificación 200x.

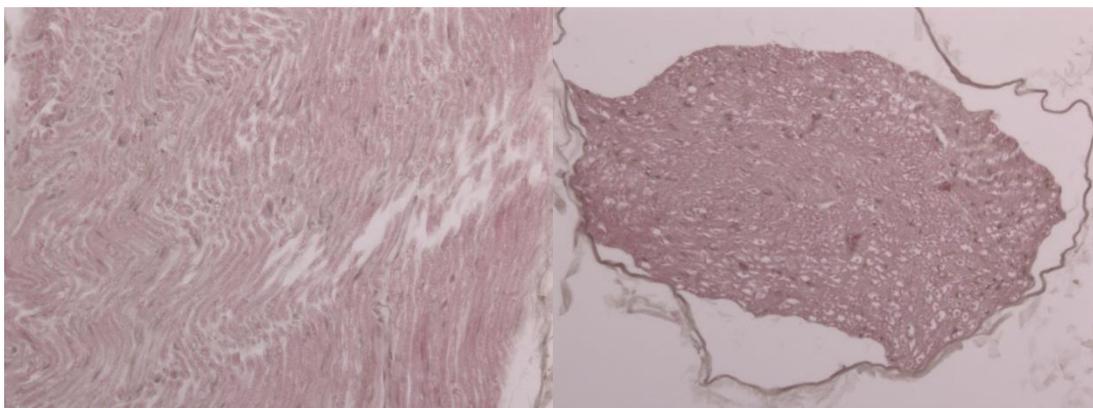


Ilustración 24. Corte longitudinal (izquierda) y transversal (derecha) de nervio ciático sano de rata control teñido con DAPI visto con microscopía de fluorescencia y magnificación de 200x.

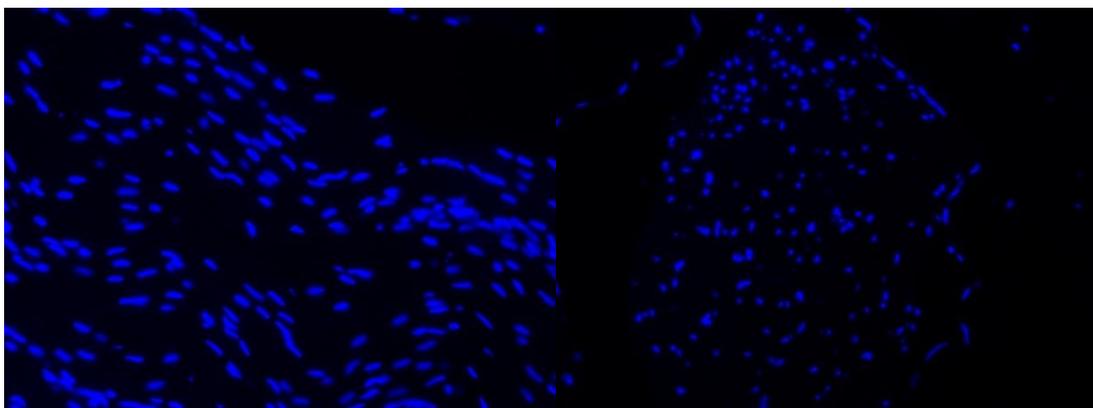


Ilustración 25. Corte transversal de aloinjerto acelular fresco de nervio ciático de rata teñido con hematoxilina-eosina visto a microscopía óptica con magnificación 50x.

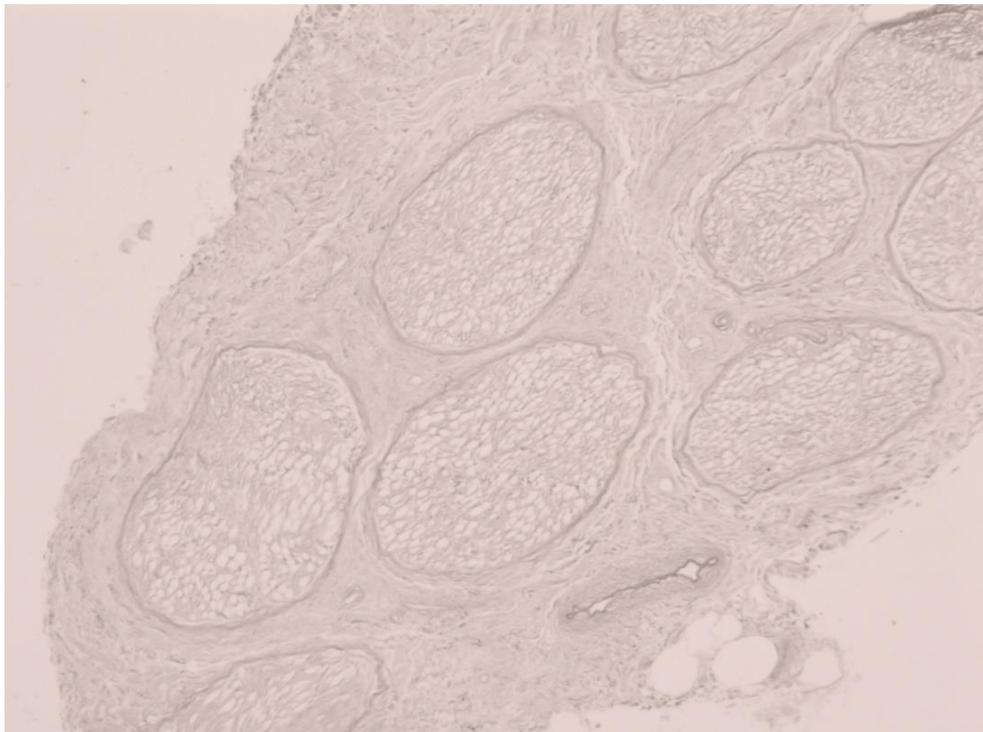


Ilustración 26. Corte transversal de aloinjerto acelular fresco de nervio ciático de rata teñido con hematoxilina-eosina visto a microscopía óptica con magnificación 100x.

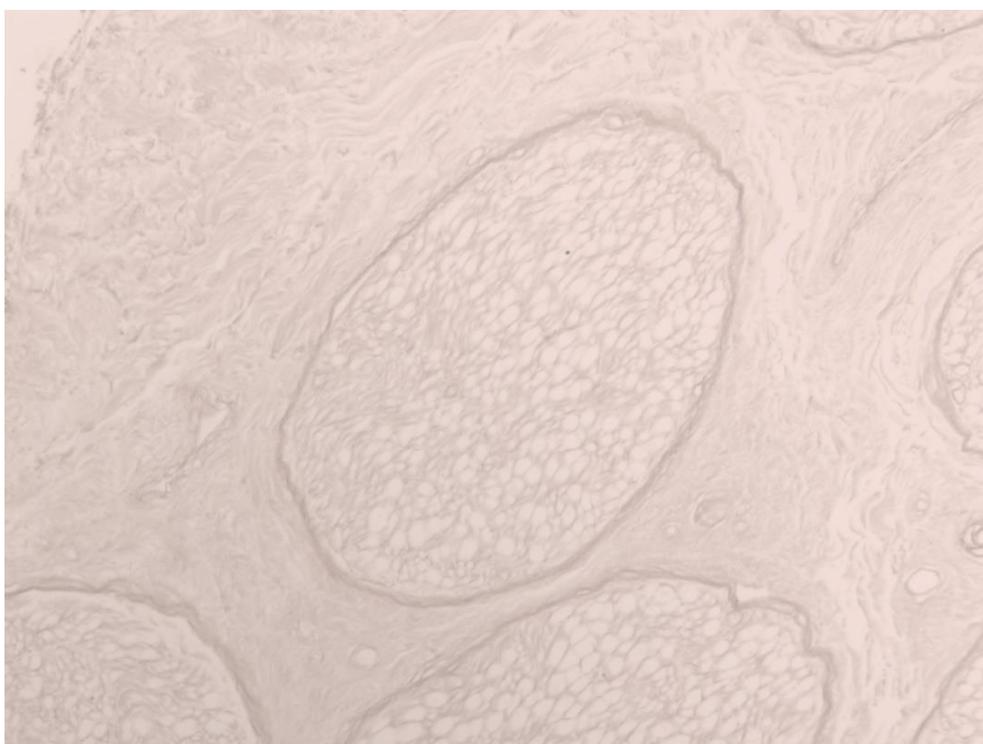


Ilustración 27. Corte longitudinal de aloinjerto acelular de nervio ciático de rata teñido con hematoxilina-eosina visto a microscopia óptica con magnificación 100x.

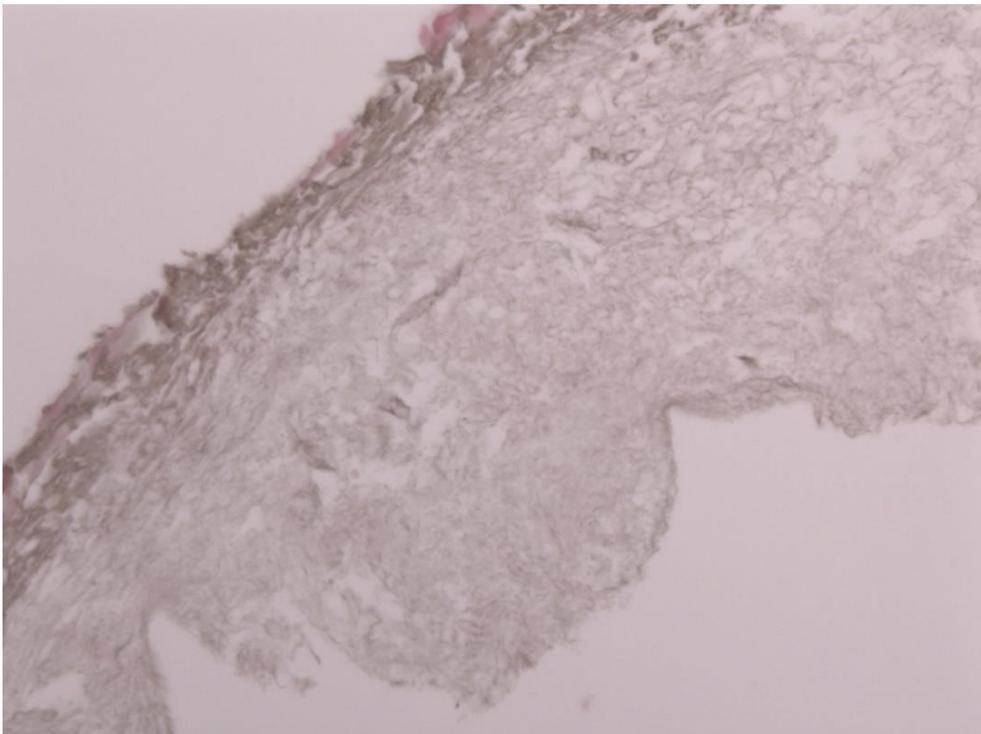


Ilustración 28. Corte longitudinal de aloinjerto acelular de nervio ciático de rata teñido con DAPI y fotografiado con microscopio de fluorescencia y magnificación de 100x.

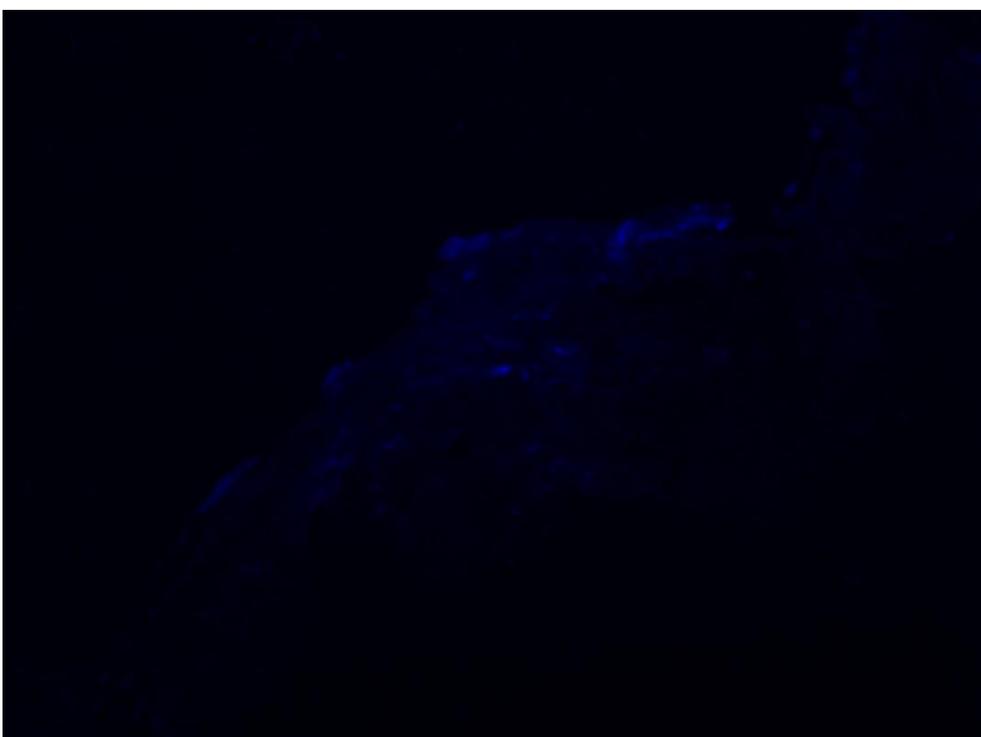


Ilustración 29. Corte longitudinal de aloinjerto acelular de nervio ciático de rata teñido con hematoxilina-eosina visto a microscopia óptica y magnificación de 200x.

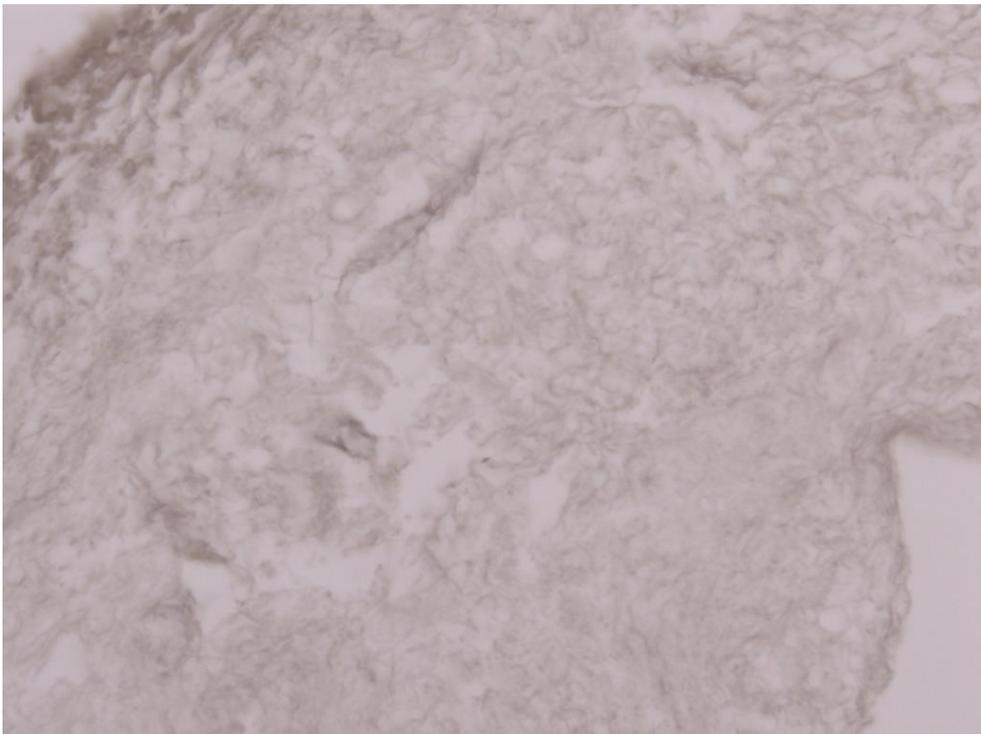


Ilustración 30. Corte longitudinal de aloinjerto acelular de nervio ciático de rata teñido con DAPI y fotografiado con microscopio de fluorescencia y magnificación de 200x.

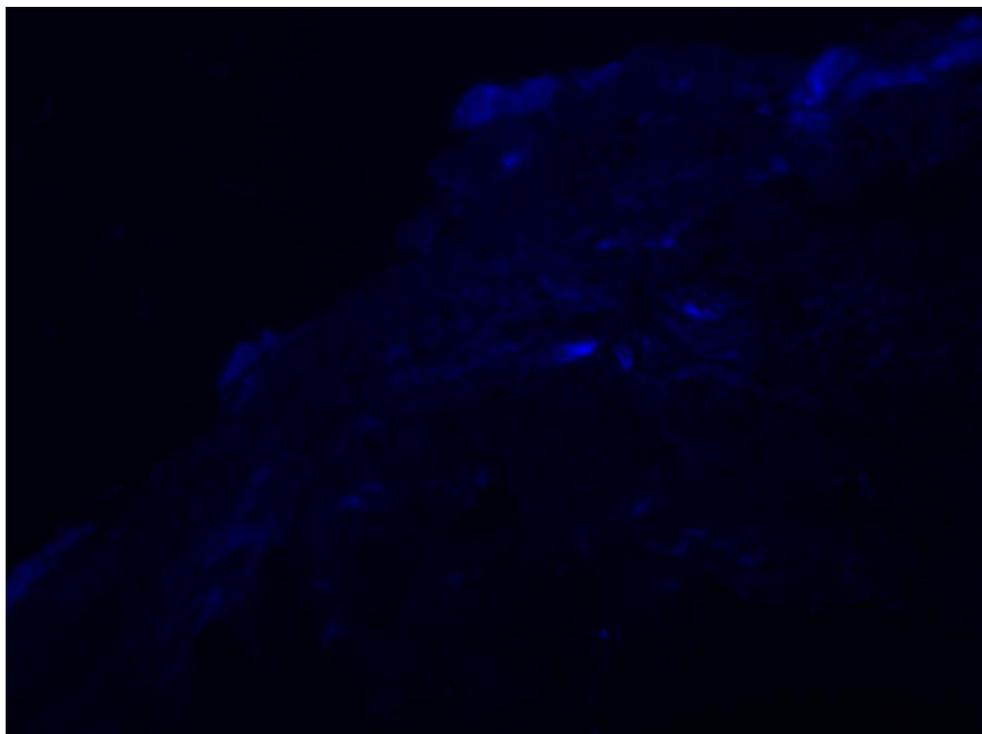
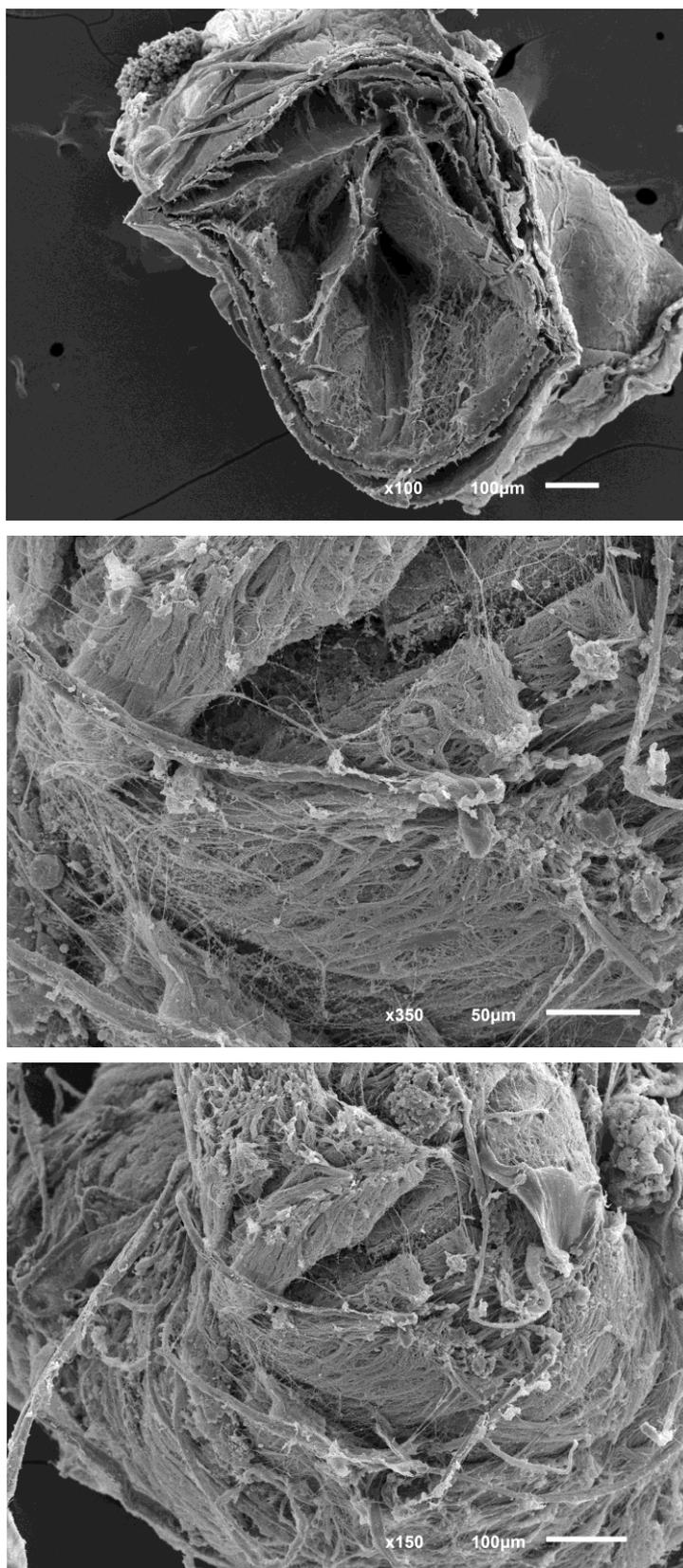


Ilustración 31. Imágenes de microscopía electrónica de barrido de corte transversal de aloinjerto acelular de nervio ciático tras procesamiento y descelularización según el protocolo descrito.



/ TÉCNICA QUIRÚRGICA

La técnica quirúrgica explicada en la sección Material y Métodos permitió la realización de todas las cirugías de forma estandarizada. Si bien al comienzo del experimento no se utilizaron ágrafes, la incidencia de los primeros casos de dehiscencia de sutura hizo que se añadiera como paso final en el cierre de la herida quirúrgica.

/ PRUEBAS FUNCIONALES

/ ANÁLISIS DE LA PISADA

Se realizó el registro de la pisada de las extremidades traseras de los animales obteniendo dos registros para cada uno de ellos. En todos los registros de la pisada de los animales se observó que, mientras la extremidad izquierda exhibía una huella completa con los dedos separados y pudiéndose distinguir entre ellos, en el lado intervenido las huellas eran estrechas y más cortas, con predominio del talón y con los dedos juntos, sin poder distinguirse entre ellos en la mayoría de los casos. No se apreciaron diferencias cualitativas entre las huellas de las extremidades traseras entre los distintos grupos. A la hora de hacer las mediciones, la distancia entre el segundo y el cuarto dedo en la extremidad intervenida no se pudo medir en ninguno de los sujetos a través de la pisada y se le otorgó un valor convenido previamente de 6 mm.

Ilustración 32. Foto del análisis de la pisada de las extremidades traseras en una rata del grupo A. En azul, la extremidad trasera izquierda y en rojo, la derecha.

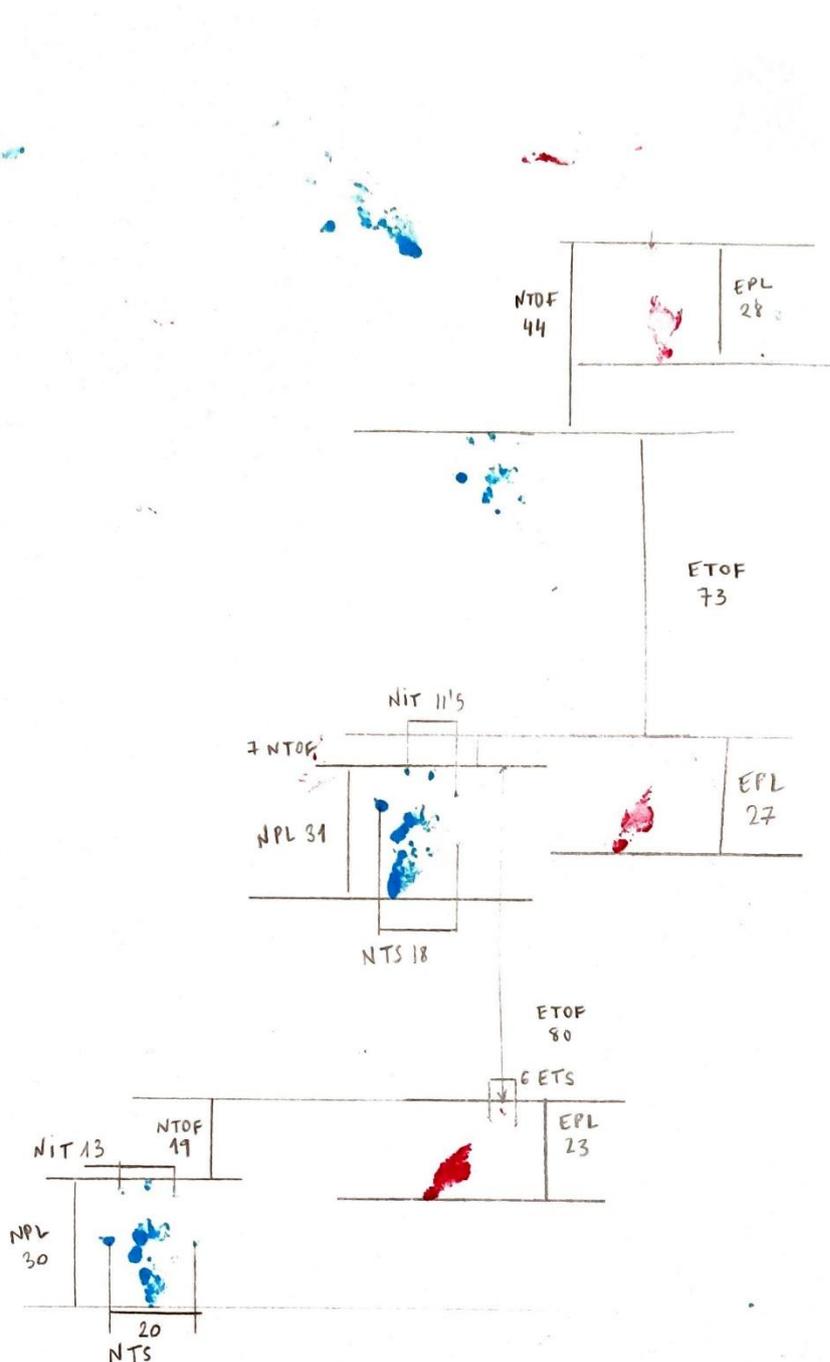


Ilustración 33. Foto del análisis de la pisada de las extremidades traseras en una rata del grupo B. En azul, la extremidad trasera izquierda y en rojo, la derecha.

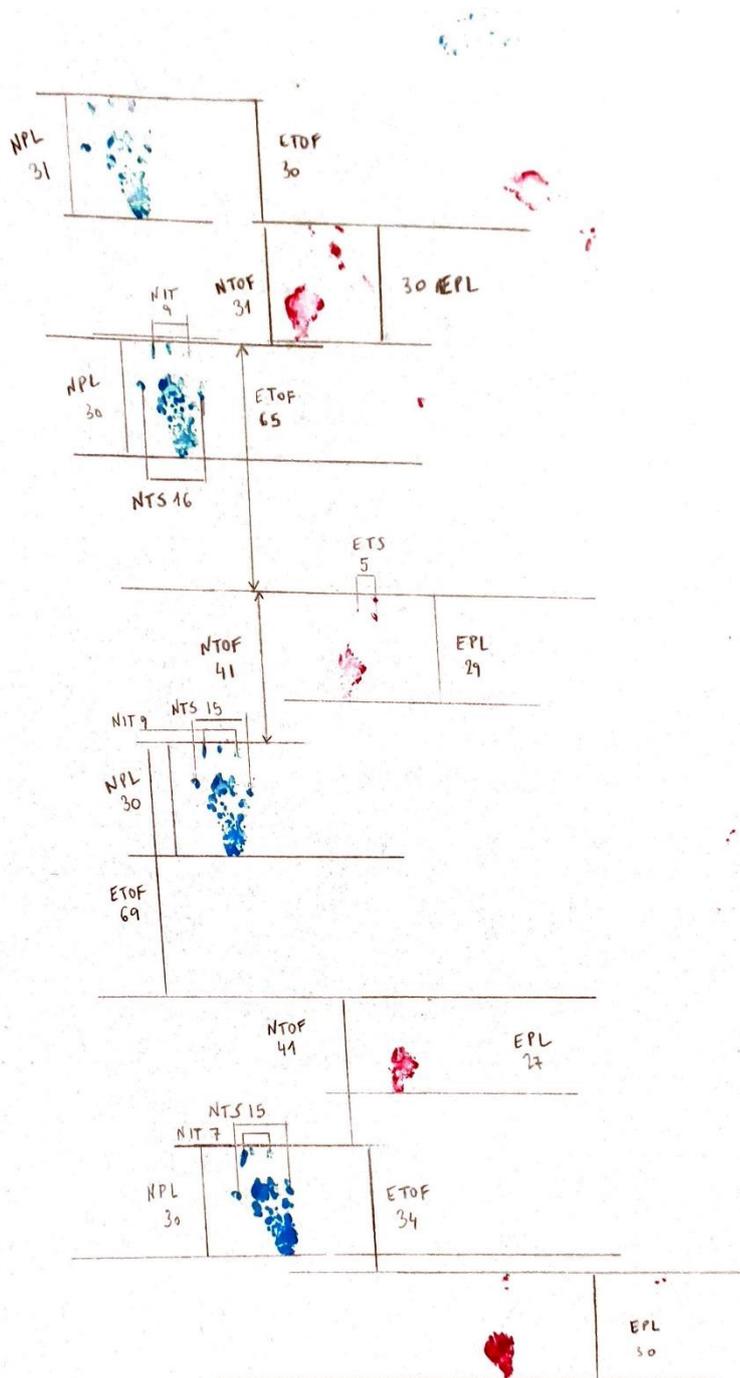


Ilustración 34. Imagen escaneada del análisis de la pisada de las extremidades traseras en una rata del grupo C. En azul, la extremidad trasera izquierda y en rojo, la derecha.

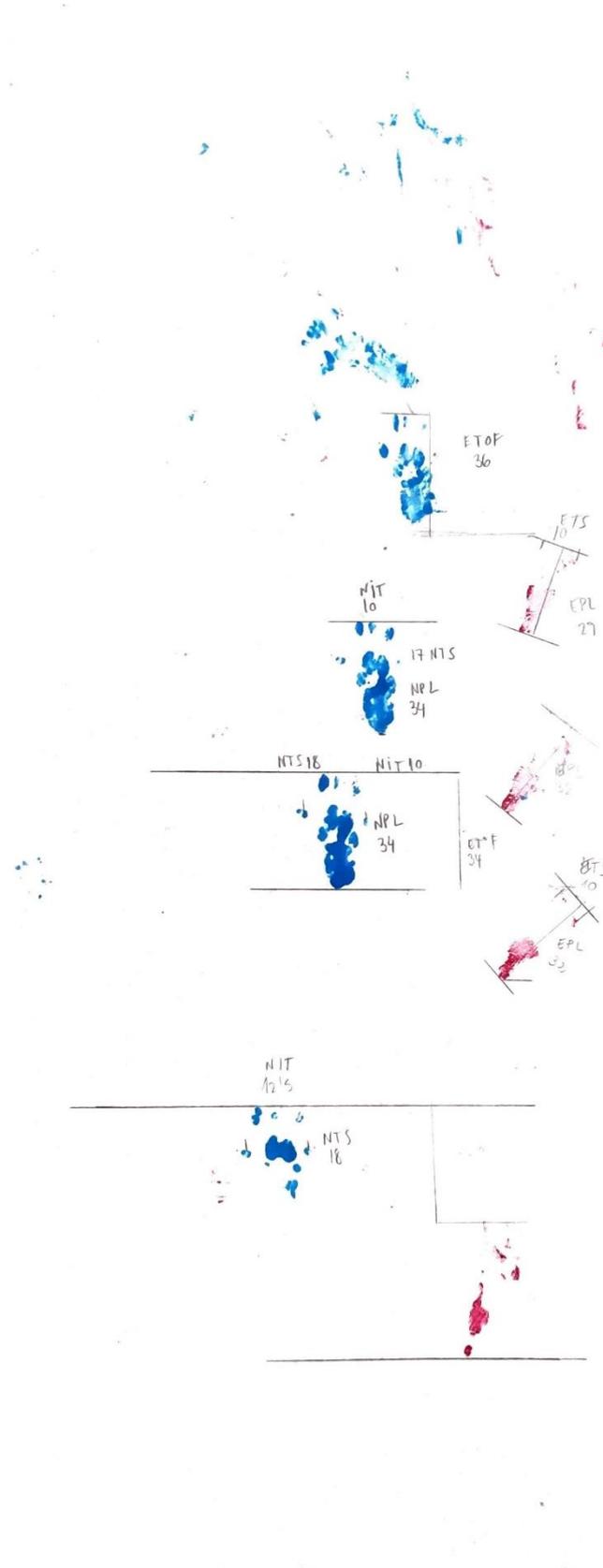
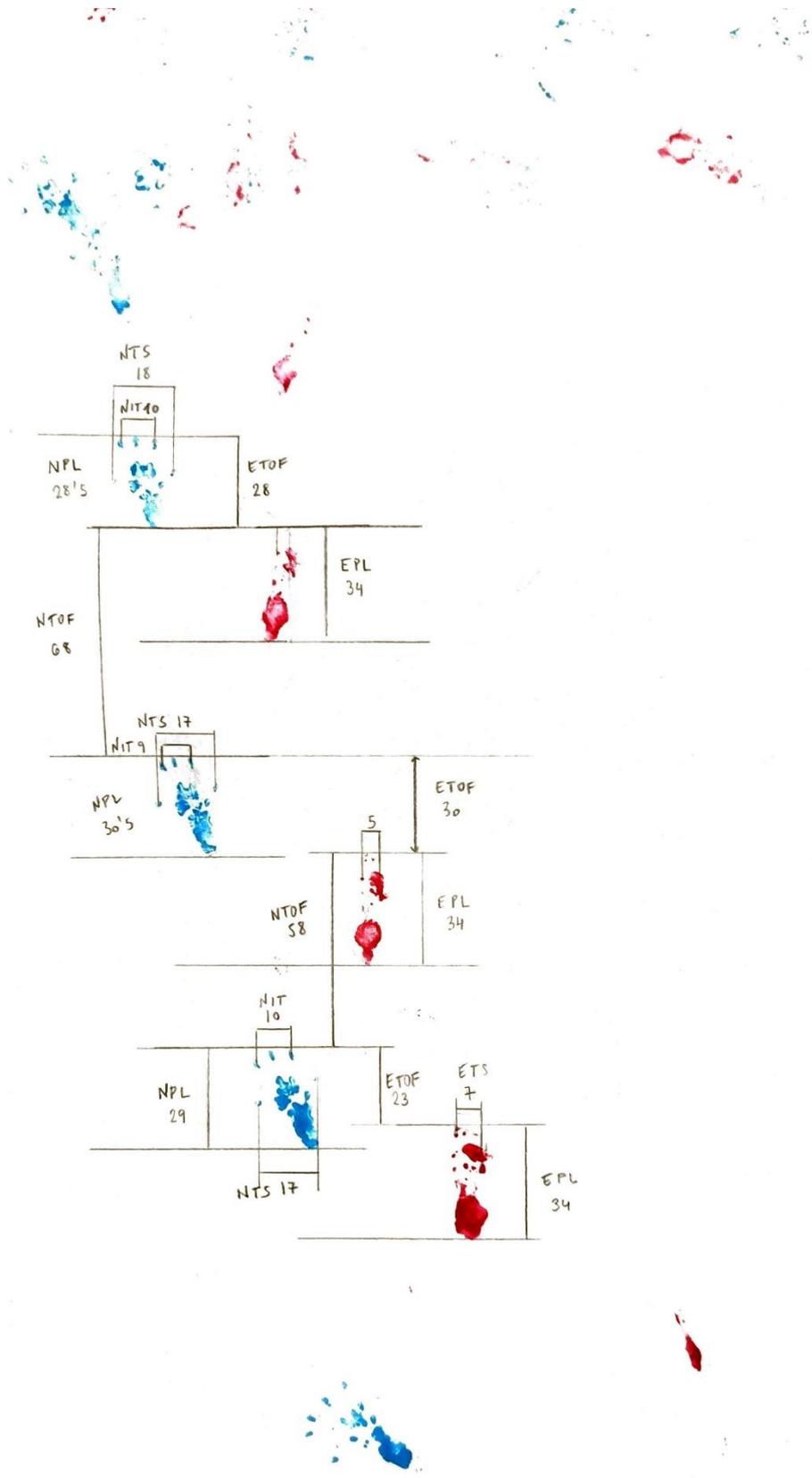


Ilustración 35. Foto del análisis de la pisada de las huellas traseras de una rata del grupo D. En azul, la extremidad trasera izquierda y en rojo, la derecha.



ÍNDICE FUNCIONAL DEL CIÁTICO, DEL TIBIAL Y DEL PERONEO

Al prestar atención a los valores resultantes del cálculo de índices funcionales, la prueba para comparar las medianas entre los grupos de Kruskal-Wallis y el ajuste posterior de Holm-Bonferroni no mostró diferencias significativas para cada uno de los índices estimados (tabla 7 y gráficos 2-4). En los grupos A, B y C, los valores más altos y, por ende, más cercanos a la normalidad (más cercanos al 0), fueron los correspondientes al índice funcional del ciático (SFI). En el caso del grupo D, el valor más alto fue el del índice funcional del peroneo. En el grupo B, C y D, los valores más bajos (más alejados del 0) se refirieron al índice funcional del tibial. Sin embargo, el valor más bajo para el grupo A fue el del índice funcional del peroneo. En todos los grupos y en todos los índices se observaron rangos amplios.

Tabla 7. Valores de los índices funcionales del nervio ciático (SFI), del tibial (TFI) y del peroneo (PFI) para cada grupo. Entre paréntesis, el tamaño muestral de cada grupo para estas variables.

Grupo (n)	SFI		TFI		PFI	
	Mediana	Rango	Mediana	Rango	Mediana	Rango
A (8)	-75,25	-96,20 - -56,44	-106,21	-130,10 - -72,48	-118,86	-207,19 - -47,87
B (7)	-80,42	-88,70 - -41,21	-102,18	-116,27 - -51,60	-82,14	-129,06 - -44,07
C (8)	-81,09	-90,30 - -61,86	-102,54	-122,83 - -81,96	-98,30	-254,33 - -60,02
D (5)	-77,49	-86,06 - -58,32	-84,07	-107,27 - -67,65	-48,91	-305,76 - -27,55

Gráfico 2. Diagrama de cajas que representa los valores del índice funcional del ciático en cada grupo.

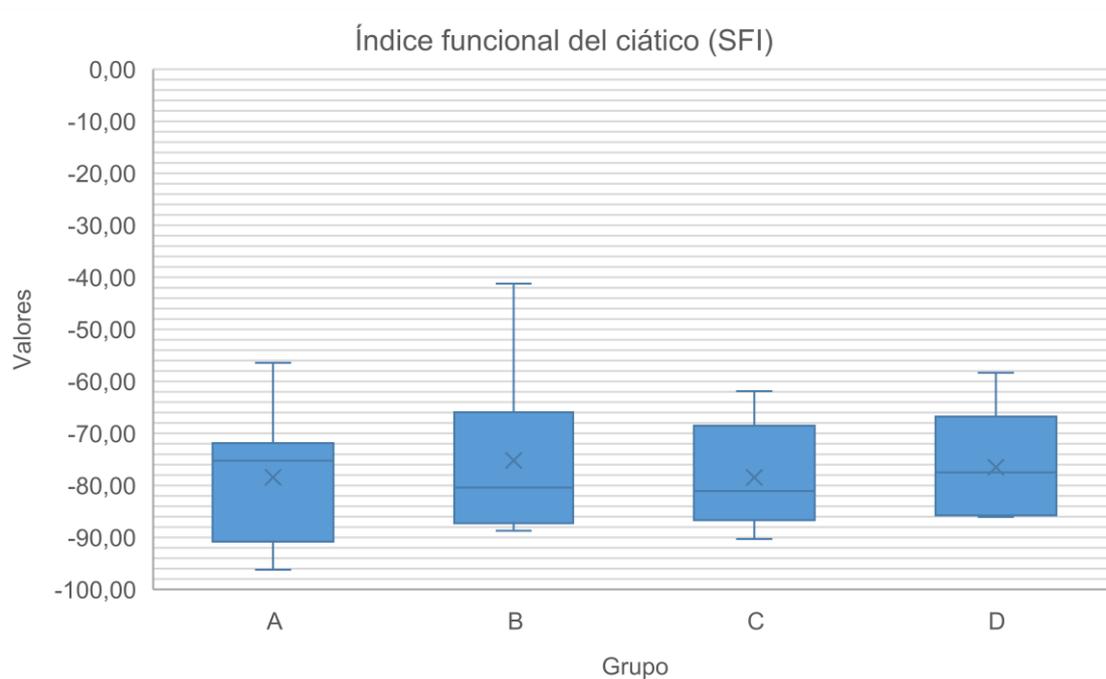


Gráfico 3. Diagrama de cajas que representa el valor del índice funcional del tibial en cada grupo.

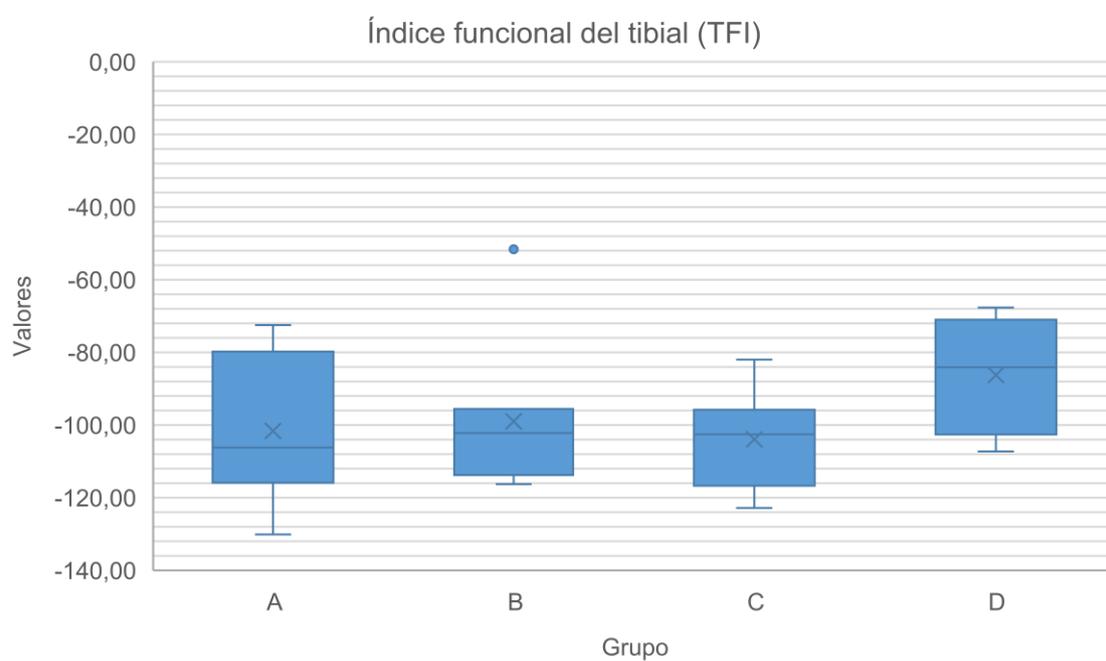
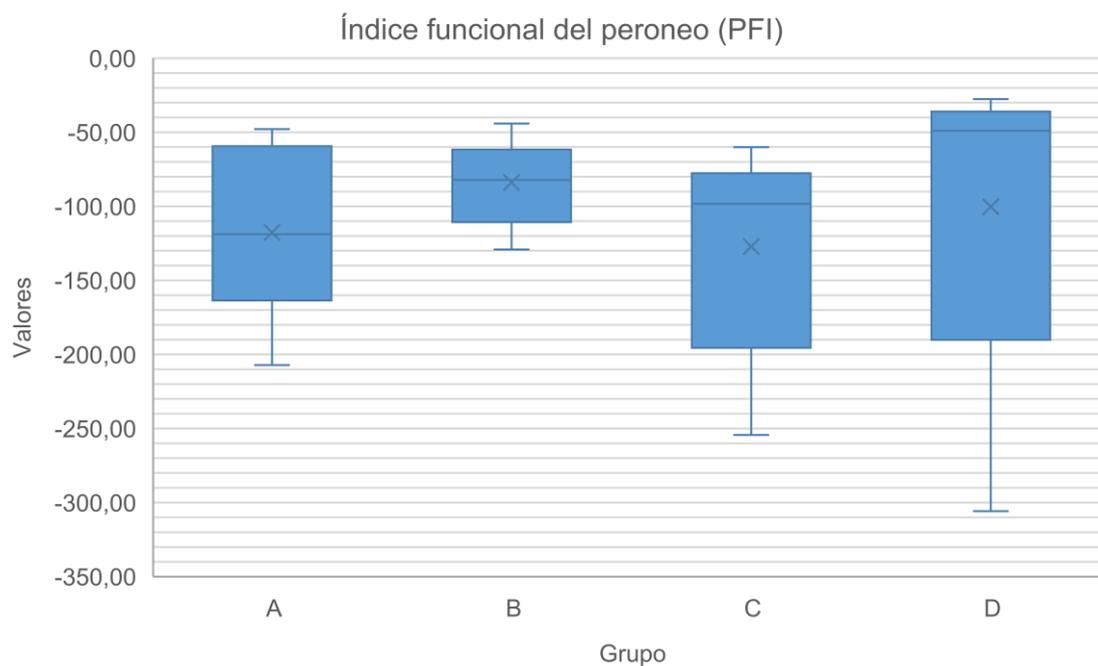


Gráfico 4. Diagrama de cajas que representa los valores del índice funcional del peroneo en cada grupo.



/ TEST DEL ROTAROD

Tras realizar el estudio del tiempo medio de latencia y de su velocidad complementaria, se constató una tendencia general al incremento progresivo de sus valores según aumentaba el número de intentos (*trials*) que realizaban los animales, independientemente del grupo experimental.

Se puede observar en las tablas 8 y 9 que tanto el tiempo medio de latencia como su velocidad complementaria se incrementaron progresivamente a medida que los animales fueron realizando más intentos, alcanzando valores máximos en el cuarto *trial* (gráficos 5 y 6).

Gráfico 5. Diagrama de cajas que representa el tiempo medio de latencia (s) en el Rotarod para cada grupo.

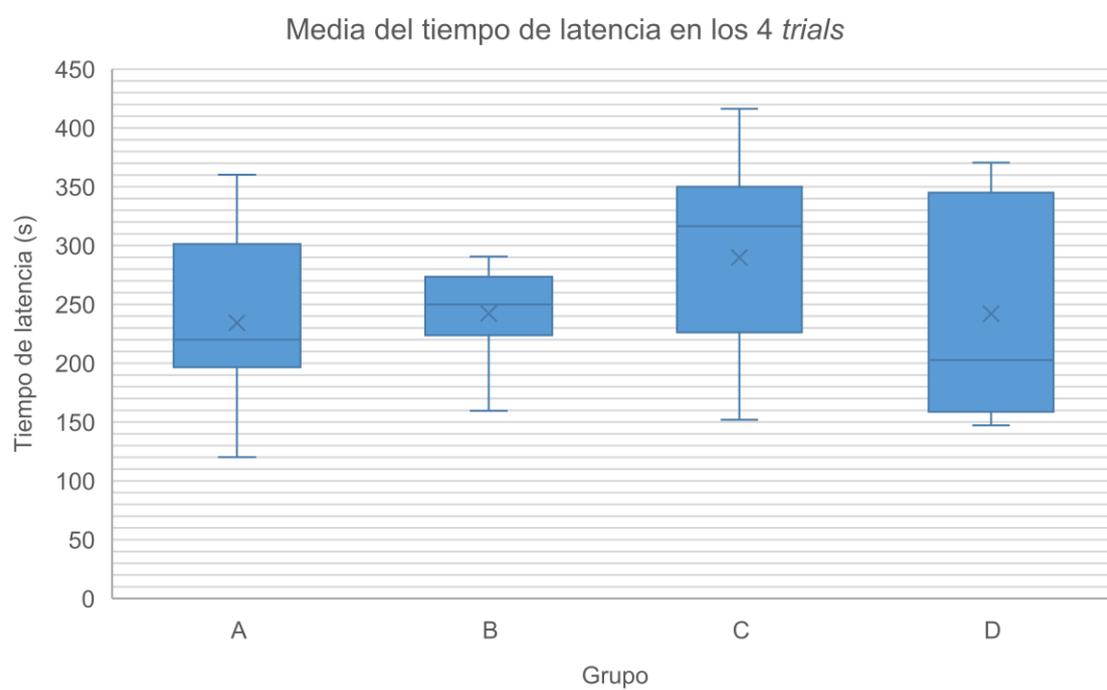


Gráfico 6. Diagrama de cajas que representa la velocidad media (rpm) en el Rotarod para cada grupo experimental.

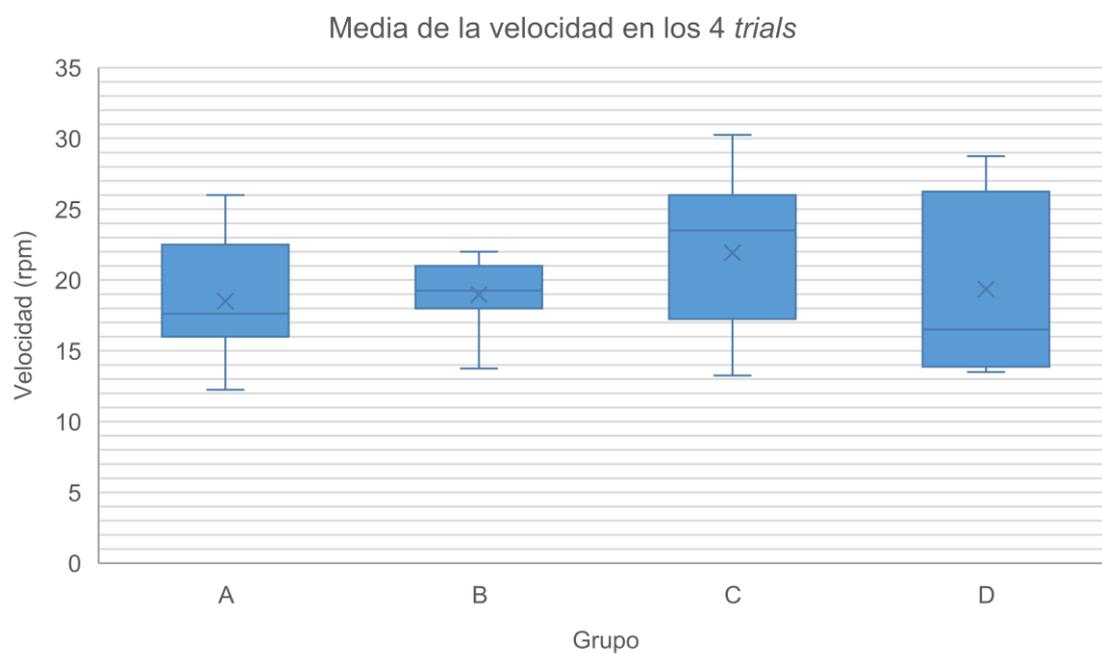


Tabla 8. Tiempo de latencia (s) en el Rotarod en cada uno de los *trials* (T1-T4) y la media de los 4 *trials* en cada uno de los grupos (Total).

Grupo (n)	T1 (s)		T2 (s)		T3 (s)		T4 (s)		Total (s)	
	Mediana	Rango	Mediana	Rango	Mediana	Rango	Mediana	Rango	Mediana	Rango
A (8)	192,50	62,00- 324,00	234,00	152,00- 297,00	209,00	148,00- 399,00	268,50	119,00- 497,00	220,13	120,25- 360,25
B (7)	209,00	194,00- 263,00	238,00	163,00- 301,00	300,00	149,00- 323,00	294,00	126,00- 306,00	250,00	159,50- 290,75
C (7)	208,00	140,00- 382,00	355,00	100,00- 468,00	336,00	147,00- 386,00	300,00	200,00- 521,00	316,50	152,00- 416,25
D (5)	221,00	157,00- 322,00	203,00	104,00- 355,00	162,00	150,00- 470,00	237,00	169,00- 421,00	202,75	147,25- 370,50

Tabla 9. Velocidad (rpm) en el Rotarod en cada uno de los *trials* (T1-T4) y la media de los 4 *trials* en cada uno de los grupos (Total).

Grupo (n)	T1 (rpm)		T2 (rpm)		T3 (rpm)		T4 (rpm)		Total (rpm)	
	Mediana	Rango	Mediana	Rango	Mediana	Rango	Mediana	Rango	Mediana	Rango
A (8)	16,00	12,00- 24,00	18,50	13,00- 22,00	17,00	13,00- 29,00	20,50	11,00- 35,00	17,63	12,25- 26,00
B (7)	17,00	16,00- 20,00	18,00	14,00- 23,00	23,00	13,00- 24,00	22,00	12,00- 23,00	19,25	13,75- 22,00
C (7)	17,00	12,00- 28,00	27,00	10,00- 33,00	25,00	13,00- 27,00	21,00	16,00- 37,00	23,50	13,25- 30,25
D (5)	18,00	14,00- 24,00	16,00	10,00- 26,00	14,00	13,00- 33,00	19,00	14,00- 37,00	16,50	13,50- 28,75

/ HISTOMORFOLOGÍA DEL NERVIIO

En la semana 20, todos los injertos nerviosos mantenían la continuidad de la sutura proximal y distal. Además, todos los injertos tenían un aspecto blanco brillante, sin signos de degeneración o rechazo. Tampoco se observó formación de neuromas ni en las suturas ni a lo largo del injerto. Sin embargo, en los animales del grupo D en los que se utilizó el tubo de silicona, se observó la ausencia o escasez de tejido nervioso a lo largo del conducto. Tanto el extremo proximal como el distal se mantuvieron uniendo los dos extremos del nervio seccionado y el cabo nervioso distal presentaba signos de atrofia.

MEDIDA DE LAS VARIABLES HISTOMORFOLÓGICAS DEL NERVIIO

Tal y como queda descrito en el apartado correspondiente de Material y Métodos, se obtuvieron imágenes para cada una de las muestras histológicas del nervio y, posteriormente, se aplicó la macro diseñada específicamente para analizar las variables histomorfológicas de tejido nervioso. La medida de las variables histomorfológicas del nervio se hizo del segmento distal, del segmento medio y del proximal. No obstante, sólo se analizaron las del segmento medio y distal para evitar un exceso de datos sin repercusión en los objetivos del trabajo. Los resultados del análisis del segmento proximal se utilizaron para poder calcular el índice de regeneración.

En la tabla 10 se muestra el registro de las muestras histológicas del nervio. En él se detalla el grupo experimental del animal (grupo), el área muestreada en cada animal (%), el segmento (medio o distal) y el número de imágenes obtenidas correspondientes al porcentaje de área muestreada. También se puntualizan aquellos animales en los que la muestra tisular fue inexistente o insuficiente, así como aquellas imágenes de muestras de mala calidad o incapaces de ser analizadas por el software utilizado. Para los animales identificados con los números 14 y 25 (sombreado naranja), se muestreó inicialmente un área del 25%, pero una de las imágenes obtenidas en cada caso no se pudo analizar por problemas técnicos, por lo que área muestreada final fue de 21,88% y 18,75%, respectivamente. En el caso de los animales 19 y 21 (sombreado gris), las imágenes obtenidas de las muestras de tejido correspondientes al segmento medio fueron de mala calidad, por lo que no pudieron tenerse en cuenta en el análisis histomorfológico pese a disponer de ellas (ilustración 36). Finalmente, el resto de

casillas en blanco se corresponden con animales de los que no pudo obtenerse tejido suficiente para poder analizarlo o este era inexistente.

Tabla 10. Indica el área muestreada (%) para el segmento medio y distal del nervio ciático de cada uno de los animales y el número de imágenes analizadas para calcular las variables histomorfológicas del nervio.

Animal	Grupo	Segmento distal		Segmento medio	
		Área muestreada (%)	Imágenes analizadas (n)	Área muestreada (%)	Imágenes analizadas (n)
1	A	25,00	9	25,00	14
2	A	25,00	8	25,00	17
3	A	25,00	15	25,00	21
4	A	25,00	10	25,00	21
5	A	25,00	25	25,00	16
6	A	25,00	2	25,00	13
7	A	25,00	20	25,00	6
8	A	10,00	13	25,00	6
9	B	25,00	15	25,00	6
10	B	25,00	7	25,00	8
11	B	25,00	4	25,00	8
12	B	25,00	12	25,00	10
13	B	25,00	5	25,00	11
14	B	21,88	7	25,00	12
15	B	25,00	10	25,00	24
16	C	25,00	6	25,00	6
17	C	25,00	4	25,00	20
18	C	25,00	9	25,00	5
19	C	25,00	13	10,00	20
20	C	25,00	6	25,00	5
21	C	25,00	9	25,00	16
22	C			25,00	10
23	C				
24	D				
25	D	18,75	3		
26	D	25,00	3		
27	D				
28	D				

Ilustración 36. Ejemplo de imágenes capturadas. A la izquierda, corte transversal semifino del segmento distal del nervio ciático de una rata del grupo A (animal nº1) teñido con azul de toluidina visto a 1000x. A la derecha, corte transversal semifino del segmento medio del nervio ciático del mismo animal teñido con azul de toluidina visto a 1000x

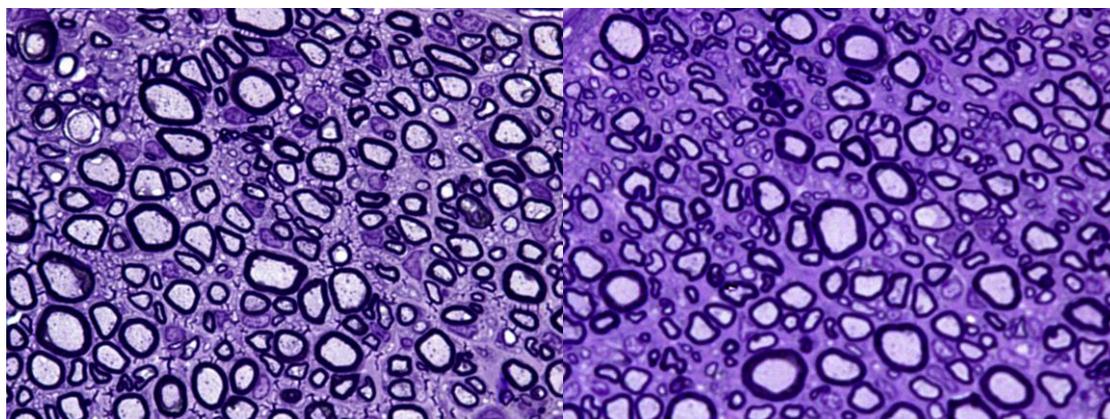
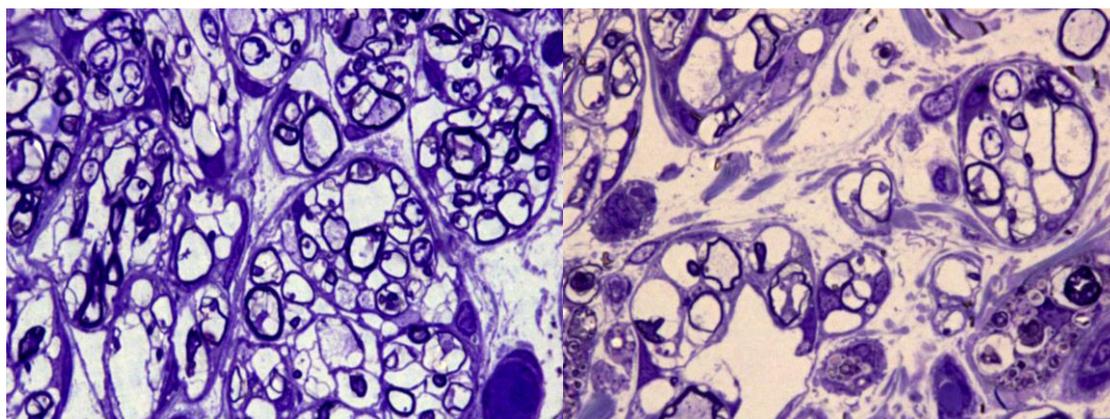


Ilustración 37. A la izquierda, corte transversal semifino del segmento medio del nervio ciático de una rata del grupo C (animal nº 19). A la derecha, corte transversal semifino del segmento medio del nervio ciático de una rata del grupo C (animal nº 21), ambos teñidos con azul de toluidina y vistos a 1000x. Se observa que las muestras no tienen la calidad suficiente como para analizarse.



Tras activar la secuencia de acciones programadas en el software, los datos se almacenaron directamente en una carpeta de archivos específica para cada segmento de nervio de un animal concreto. En cada carpeta se creó de forma automática un fichero resumiendo todas las variables medidas en cada una de las imágenes correspondientes al segmento de nervio ciático de un animal concreto (tabla 11).

Tabla 11. Ejemplo de archivo .xlsx resultante del análisis de las 12 imágenes del segmento distal de nervio ciático derecho de la rata identificada como I3 (grupo B), analizadas con el programa Fiji.

Nombre de la imagen	Área de la imagen (μm^2)	Nº axones	Diámetro mínimo axón (μm)	Área media axones (μm^2)	Espesor medio de vaina de mielina (μm)	Desviación estándar espesor medio vaina mielina (μm)
I1D01	5704,2534	46	0,9790	12,4630	34,4410	0,6164
I1D02	5704,2534	34	1,5030	13,2710	3,5310	0,6969
I1D03	5704,2534	52	1,3090	11,0930	3,1380	0,5219
I1D04	5704,2534	89	1,1700	10,3090	34,4410	0,6716
I1D05	5704,2534	51	1,0220	0,8834	25,2460	0,5779
I1D06	5704,2534	70	1,2480	0,8600	2,1760	0,4515
I1D07	5704,2534	58	1,3780	12,9130	30,7730	0,7155
I1D08	5704,2534	63	1,3890	10,6560	28,1890	0,5411
I1D09	5704,2534	141	1,3740	0,8585	20,9940	0,3868
I1D10	5704,2534	80	1,555	10,9320	3,9680	0,6937
I1D11	5704,2534	116	1,198	11,3790	31,665	0,6489
I1D12	5704,2534	104	1,441	10,1380	27,213	0,5095

A partir de estos datos y, tal y como se describe en el apartado de Material y Métodos, se obtuvieron los valores definitivos de las variables calculadas por Fiji y dos variables de interés adicionales: el porcentaje de tejido nervioso (%) y el índice de regeneración (ilustraciones 37 y 38).

Ilustración 38. Captura de pantalla del programa Fiji ejecutando la macro. Se observa corte transversal de segmento distal de un animal del grupo B teñido con azul de toluidina visto a 1000x. Resaltado en verde los axones seleccionados automáticamente por el programa.

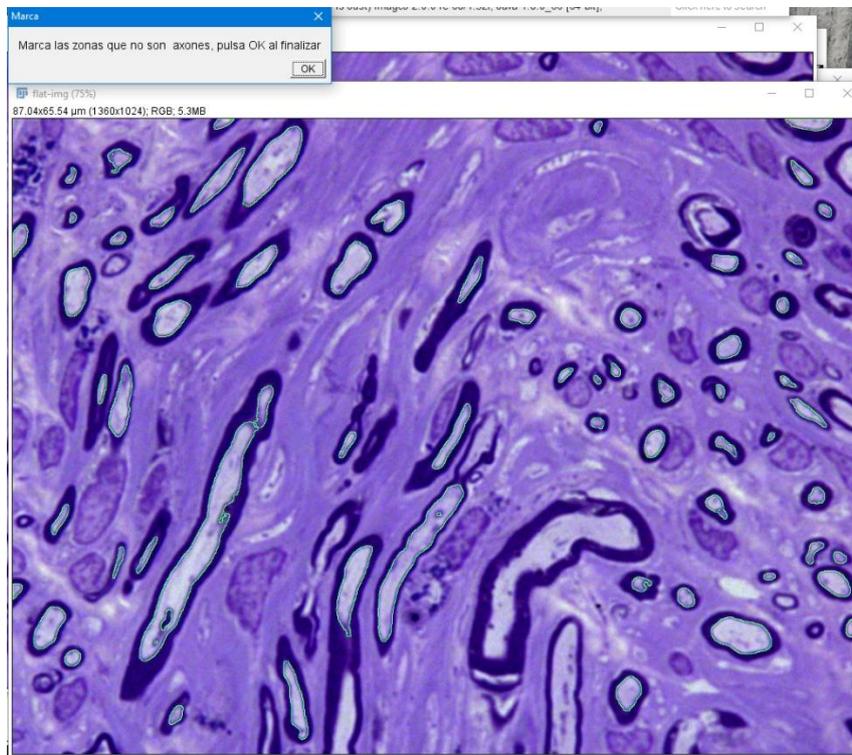
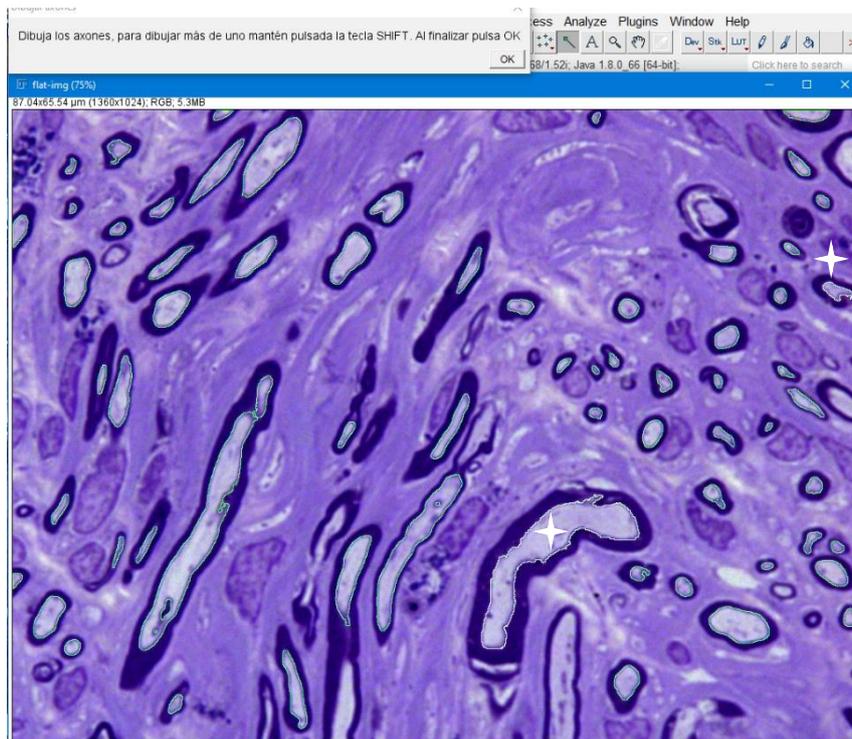


Ilustración 39. Captura de pantalla del programa Fiji. Corte transversal de segmento distal de un animal del grupo B teñido con azul de toluidina 1000x. Se observa resaltado en verde los axones seleccionados tras haber añadido manualmente algún axón (estrella blanca).



DESCRIPCIÓN Y CÁLCULO DE LAS VARIABLES HISTOLÓGICAS

Las variables histomorfológicas del segmento medio y segmento distal del nervio ciático incluidas en esta sección son aquellas que tienen relevancia experimental, obviando aquellas que se utilizaron como paso intermedio para poder calcular las variables de interés aquí descritas. Del segmento proximal sólo se utilizó el número de axones para poder calcular así el índice de regeneración. También se incluyen los datos obtenidos correspondientes al segmento medio de nervio ciático normal (lado izquierdo) con interés descriptivo, pero no se tuvieron en cuenta para ningún contraste de hipótesis o representación gráfica (tabla 12). Naturalmente, dado que no se realizó el análisis de un segmento proximal y otro distal de nervio ciático sano, no se pudo calcular el índice de regeneración para los nervios sanos de la extremidad izquierda de los animales. Aunque en las tablas se expresen la media y la desviación típica, todas las referencias a los resultados se basan en los valores de la mediana y el rango. Sólo aquellas variables con diferencias significativas o cercanas a la significación se acompañaron de representación gráfica.

Tabla 12. Variables histomorfológicas del nervio ciático sano correspondiente a la extremidad izquierda de 9 animales.

Variables histomorfológicas	Mediana	Mínimo	Máximo	Media	Desviación típica
Densidad (n/100 μm^2)	1,48	0,80	1,82	1,39	0,29
Axones (n)	3.710,50	1.992,00	4.561,00	3.481,83	737,03
Diámetro (μm)	3,81	3,07	4,51	3,84	0,54
Área (μm^2)	18,41	15,34	35,29	22,21	7,03
Espesor mielina (μm)	15,94	12,43	20,81	15,93	3,16
Tejido nervioso (%)	27,99	22,44	37,68	29,39	5,31

Tras el cálculo del número de axones normalizados en el segmento distal del nervio reparado en cada uno de los grupos, no se observaron diferencias significativas entre los grupos tras realizar el contraste de hipótesis (tablas 13 y 14). En el caso del segmento medio, sí se detectaron diferencias en el número de axones de cada grupo, pero éstas dejaron de ser significativas tras el ajuste de Holm-Bonferroni. Tanto en el segmento distal como en el segmento medio, el mayor número de axones correspondió a los nervios del grupo A (gráficos 7 y 8). Si bien en el caso del grupo A el número de

axones en el segmento medio era prácticamente el doble que el del segmento distal, en el grupo B y C no se observó la misma tendencia. En el grupo D no se consiguió muestra de tejido del segmento medio para poder analizarlo (gráfico 8).

Tabla 13. Número de axones normalizado en el **segmento distal** de los nervios analizados de cada grupo. La n indica el número de muestras incluidas en el análisis.

Grupo (n)	Mediana	Mínimo	Máximo	Media	Desviación típica
A (8)	4.483,00	2.854,00	8.400,00	5.113,12	2.213,82
B (7)	3.301,50	2.888,00	5.290,00	3.800,89	984,05
C (6)	2.593,00	1.038,00	5.576,00	2.952,88	1.646,56
D (2)	1.511,88	14,00	3.009,00	1.511,88	2.117,61

Tabla 14. Número de axones normalizado en el **segmento medio** de los nervios analizados de cada grupo. La n indica el número de muestras incluidas en el análisis.

Grupo (n)	Mediana	Mínimo	Máximo	Media	Desviación típica
A (8)	8.628,00	409,00	9.636,00	7.017,62	3.375,08
B (7)	2.526,00	1.256,00	5.698,00	3.099,43	1.569,71
C (5)	3.184,00	1.670,00	3.936,00	3.025,60	971,64
D (0)					

Gráfico 7. Diagrama de cajas que representa el número de axones normalizado (n) en el segmento distal de cada grupo experimental (A-D).

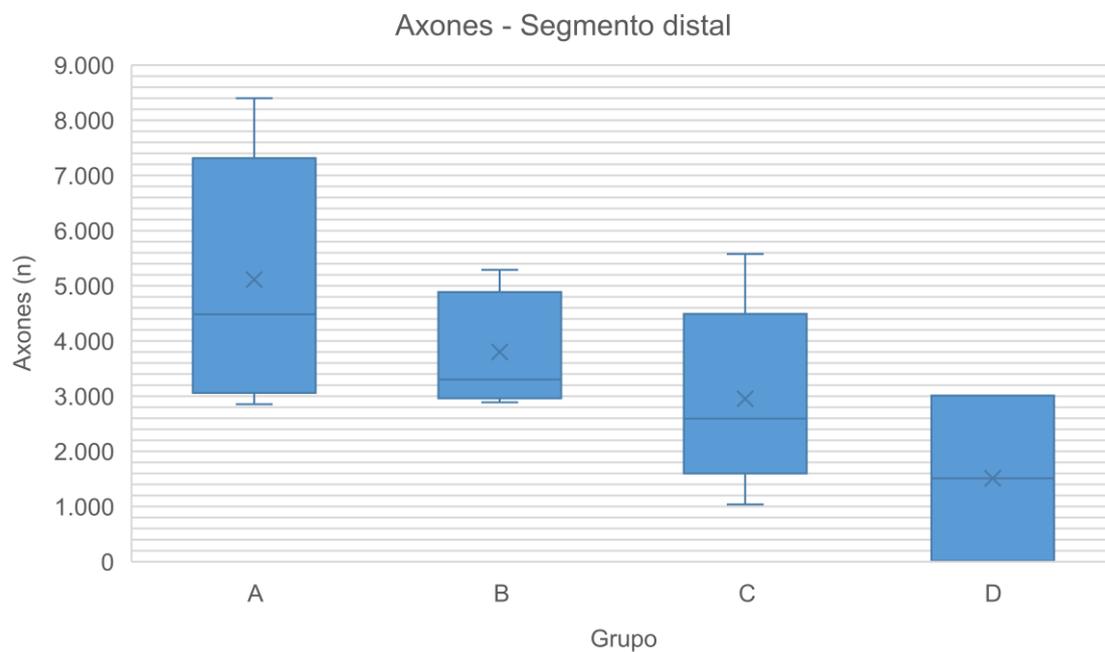
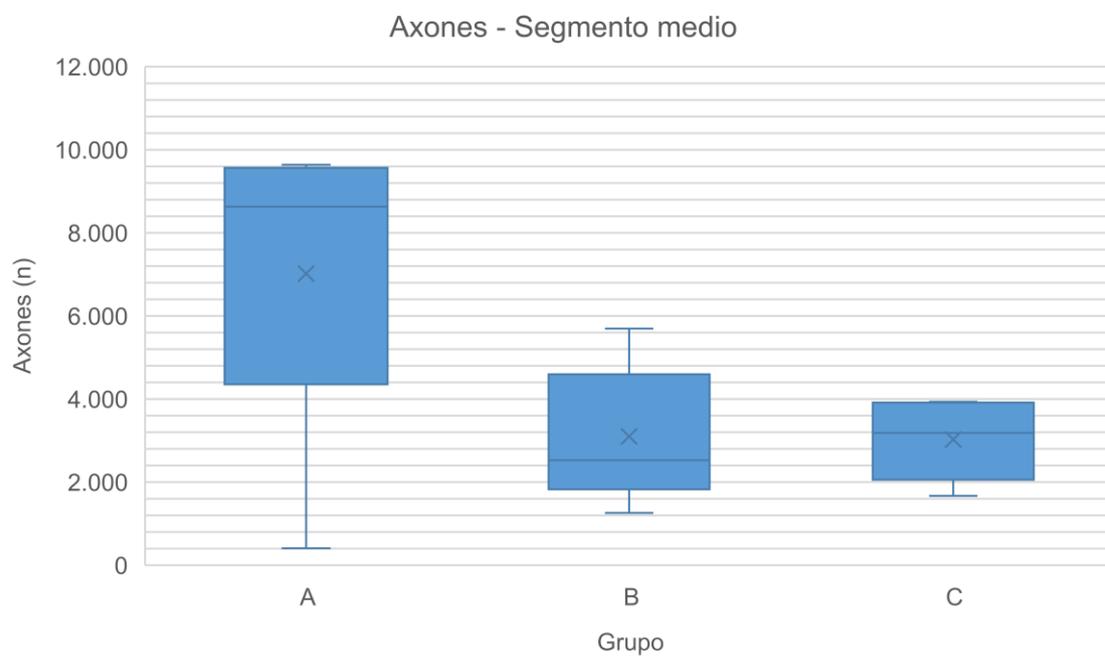


Gráfico 8. Diagrama de cajas que representa el número de axones normalizado (n) en el segmento medio de cada grupo experimental (A-C).



La mayor densidad de fibras nerviosas tanto en el segmento medio como en el distal perteneció al grupo A. En el segmento distal, el grupo A fue seguido en orden descendente por el B, C y D (tabla 15). En el segmento medio, tras el grupo A fue el grupo C el que presentó una mayor densidad (tabla 16). En ninguno de los dos segmentos las diferencias alcanzaron la significación estadística tras el ajuste de Holm-Bonferroni, aunque en el segmento medio sí eran significativas inicialmente. La tendencia es similar a lo que se detectó en el número de axones. Este detalle se observa mejor en los diagramas de cajas (gráficos 9 y 10) que mostraban formas muy similares para ambas variables.

Tabla 15. Densidad de fibras nerviosas (número de axones/100 μm^2) en el **segmento distal** de los nervios analizados de cada grupo. La n indica el número de muestras incluidas en el análisis.

Grupo (n)	Mediana	Mínimo	Máximo	Media	Desviación típica
A (8)	1,79	1,14	3,36	2,05	0,89
B (7)	1,32	1,16	2,12	1,52	0,39
C (6)	1,04	0,42	2,23	1,18	0,66
D (2)	0,60	0,01	1,20	0,60	0,85

Tabla 16. Densidad de fibras nerviosas (número de axones/100 μm^2) en el **segmento medio** de los nervios analizados de cada grupo. La n indica el número de muestras incluidas en el análisis.

Grupo (n)	Mediana	Mínimo	Máximo	Media	Desviación típica
A (8)	3,45	0,16	3,85	2,81	1,35
B (7)	1,01	0,50	2,28	1,24	0,63
C (5)	1,27	0,67	1,57	1,21	0,39
D (0)					

Gráfico 9. Diagrama de cajas que representa la densidad de fibras nerviosas (número de axones/100 μm^2) en el **segmento distal** de cada grupo experimental (A-D).

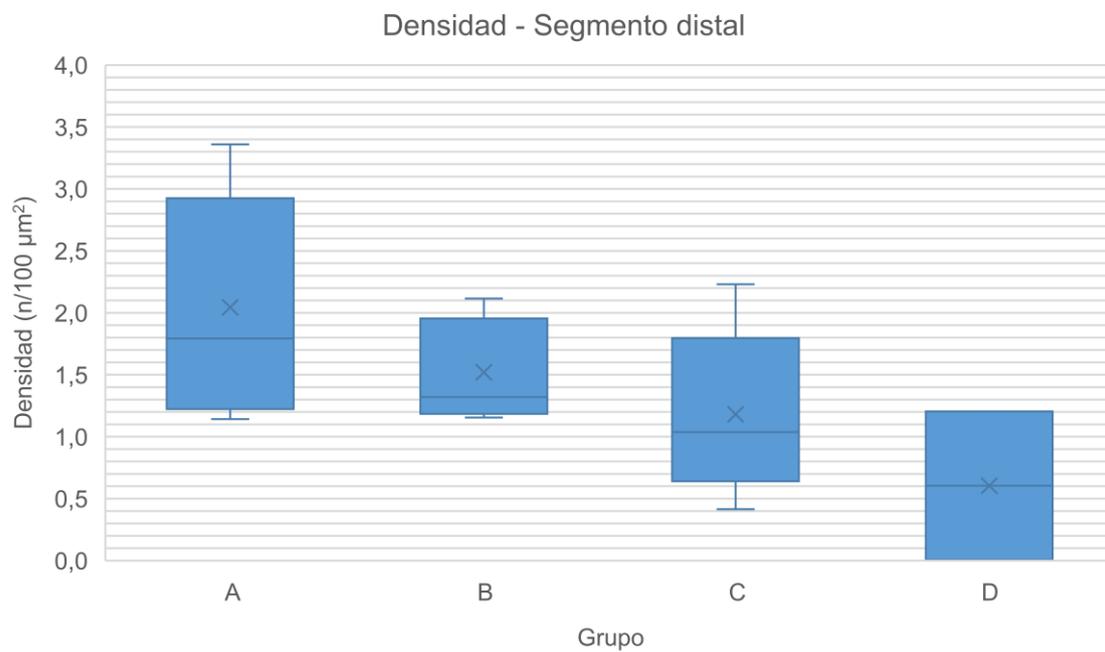
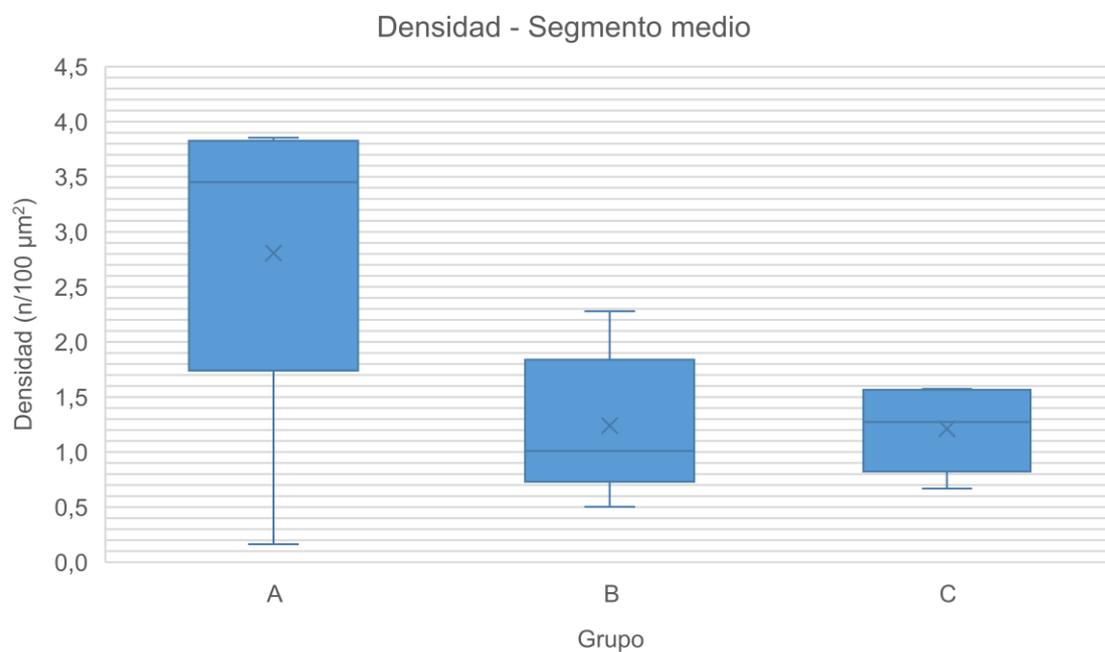


Gráfico 10. Diagrama de cajas que representa la densidad de fibras nerviosas (número de axones/100 μm^2) en el **segmento medio** de cada grupo experimental (A-C).



No se identificaron diferencias significativas en el diámetro de los axones de los nervios de los distintos grupos experimentales, ni en el segmento distal ni en el medio (tablas 17 y 18). En el segmento distal, la prueba de comparación de medianas sí alcanzó la significación, pero tras el ajuste posterior las diferencias dejaron de ser estadísticamente significativas (tabla 17, gráfico 11). De forma generalizada, sí se constató que el diámetro de los axones era mayor en el segmento medio que en el distal para todos los grupos. En las muestras obtenidas del grupo D no se pudo adquirir el diámetro de los axones detectados.

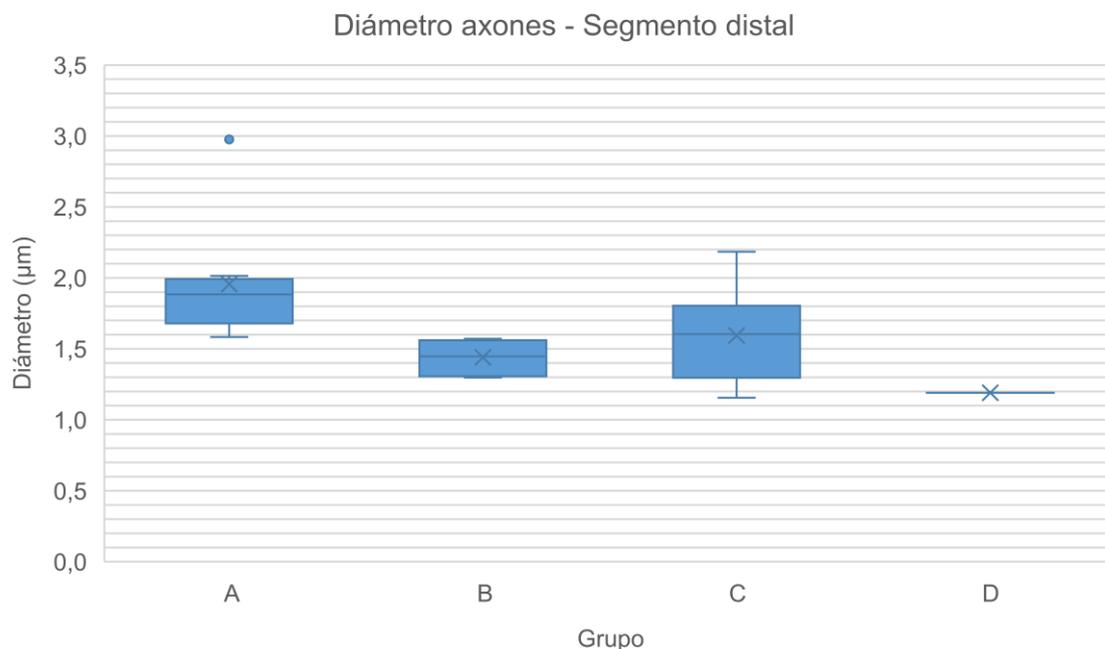
Tabla 17. Diámetro de los axones (μm) en el **segmento distal** de los nervios analizados de cada grupo. La n indica el número de muestras incluidas en el análisis.

Grupo (n)	Mediana	Mínimo	Máximo	Media	Desviación típica
A (8)	1,88	1,58	2,98	1,96	0,44
B (7)	1,45	1,30	1,57	1,44	0,12
C (6)	1,60	1,16	2,18	1,59	0,35
D (0)					

Tabla 18. Diámetro de los axones (μm) en el **segmento medio** de los nervios analizados de cada grupo. La n indica el número de muestras incluidas en el análisis.

Grupo (n)	Mediana	Mínimo	Máximo	Media	Desviación típica
A (8)	1,88	1,58	2,98	1,96	0,44
B (7)	1,45	1,30	1,57	1,44	0,12
C (6)	1,60	1,16	2,18	1,59	0,35
D (0)					

Gráfico 11. Diagrama de cajas que representa el diámetro de los axones (μm) en el **segmento distal** de cada grupo experimental (A-D).



Por lo que respecta al área de los axones detectados en el segmento distal del nervio ciático de los animales de cada grupo experimental, no se detectaron diferencias significativas, aunque la p-valor quedó cercana a la significación en la prueba de comparación de medianas (tabla 19, gráfico 12). Tampoco se observaron diferencias en el área de los axones contabilizados en el segmento medio (tabla 20). En ninguno de los dos segmentos de los animales del grupo D se consiguió muestra de calidad suficiente como para poder calcular el área de los axones. Únicamente cabría destacar la amplitud del rango, que indica una gran variabilidad en el tamaño de los axones dentro de un mismo segmento y grupo experimental.

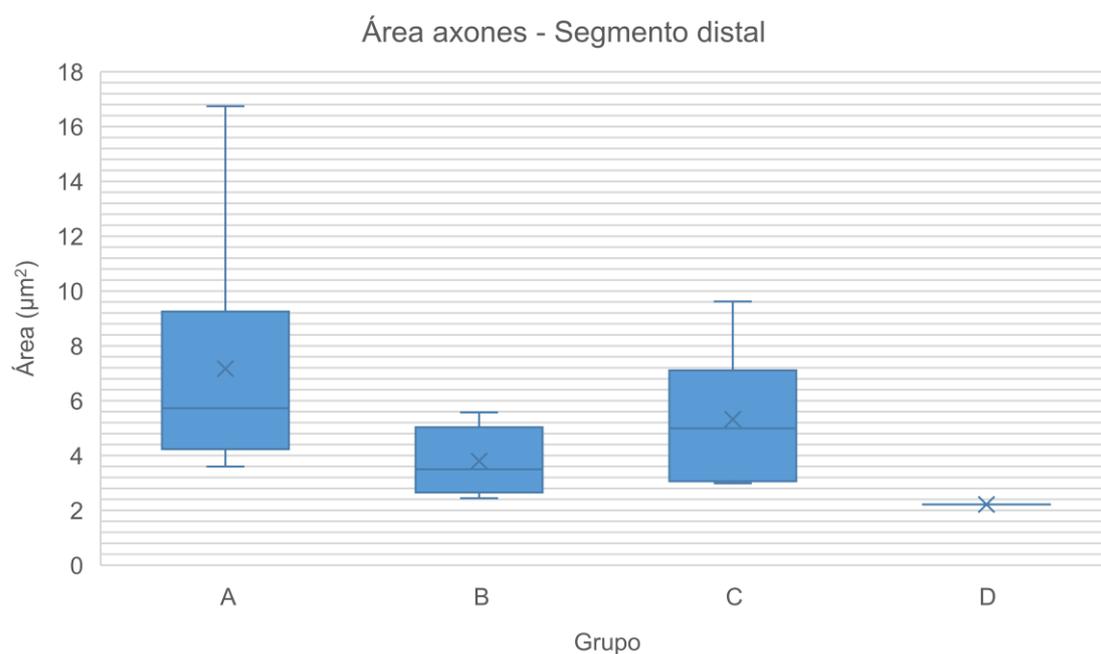
Tabla 19. Área del axón (μm^2) en el **segmento distal** de los nervios analizados de cada grupo. La n indica el número de muestras incluidas en el análisis.

Grupo (n)	Mediana	Mínimo	Máximo	Media	Desviación típica
A (8)	5,73	3,60	16,74	7,16	4,38
B (7)	3,50	2,44	5,57	3,80	1,16
C (6)	4,99	2,99	9,62	5,32	2,47
D (0)					

Tabla 20. Área del axón (μm^2) en el **segmento medio** de los nervios analizados de cada grupo. La n indica el número de muestras incluidas en el análisis.

Grupo (n)	Mediana	Mínimo	Máximo	Media	Desviación típica
A (8)	5,40	2,30	11,53	5,69	2,65
B (7)	4,86	3,05	10,79	6,19	3,06
C (5)	6,68	5,61	7,66	6,64	0,75
D (0)					

Gráfico 12. Diagrama de cajas que representa el área de los axones (μm^2) en el **segmento distal** de nervio ciático de cada grupo experimental (A-D).



En el caso del espesor de la vaina de mielina (μm), tampoco se detectaron diferencias significativas entre los grupos en ninguno de los dos segmentos analizados. Se constató una gran variabilidad en los valores, ejemplificada en el amplio rango de espesores de vaina en los axones medidos (tablas 21 y 22).

Tabla 21. Espesor de la vaina de mielina (μm) en el **segmento distal** de los nervios analizados de cada grupo. La n indica el número de muestras incluidas en el análisis.

Grupo (n)	Mediana	Mínimo	Máximo	Media	Desviación típica
A (8)	5,23	0,75	17,08	6,30	5,68
B (7)	3,39	0,76	10,45	4,58	3,62
C (6)	6,60	0,80	12,71	6,40	4,20
D (0)					

Tabla 22. Espesor de la vaina de mielina (μm) en el **segmento medio** de los nervios analizados de cada grupo. La n indica el número de muestras incluidas en el análisis.

Grupo (n)	Mediana	Mínimo	Máximo	Media	Desviación típica
A (8)	2,10	0,43	13,86	3,16	4,42
B (7)	4,37	0,70	12,72	4,82	4,34
C (5)	2,78	0,76	3,27	2,10	1,23
D (0)					

La cantidad de tejido nervioso, esto es, de axones en relación al resto de componentes que forman la sección de un nervio ciático se estimó en función del porcentaje de tejido nervioso. Tanto en el segmento distal como en el medio, el grupo A presentó la mayor proporción de tejido nervioso con valores que duplicaban los presentes en los grupos B y C (tablas 23 y 24). Si bien las diferencias eran significativas al realizar la prueba de comparación de medianas de Kruskal-Wallis (segmento distal p-valor = 0,006; segmento medio p-valor = 0,018), dejaron de serlo tras someterse al ajuste de Holm-Bonferroni. Como es natural, al no haberse podido estimar el área de los axones contabilizados en las muestras del grupo D, tampoco se pudo obtener datos acerca del porcentaje de tejido nervioso en ninguno de los dos segmentos. Tras estudiar los datos, se evidenció mayor proporción de tejido nervioso en el segmento medio que en el segmento distal en cada uno de los grupos estudiados.

Tabla 23. Porcentaje de tejido nervioso (%) en el **segmento distal** de los nervios analizados de cada grupo. La n indica el número de muestras incluidas en el análisis.

Grupo (n)	Mediana	Mínimo	Máximo	Media	Desviación típica
A (8)	11,49	6,91	21,07	12,87	5,43
B (7)	5,61	2,82	8,40	5,69	1,86
C (6)	5,62	2,21	8,97	5,52	2,40
D (0)					

Tabla 24. Porcentaje de tejido nervioso (%) en el **segmento medio** de los nervios analizados de cada grupo. La n indica el número de muestras incluidas en el análisis.

Grupo (n)	Mediana	Mínimo	Máximo	Media	Desviación típica
A (8)	17,62	0,38	23,32	15,96	7,19
B (7)	6,46	2,22	10,67	6,87	2,96
C (5)	8,05	5,11	10,80	7,87	2,18
D (0)					

Gráfico 13. Diagrama de cajas que representa el porcentaje de tejido nervioso en el **segmento distal** de nervio ciático de cada grupo experimental (A-D).

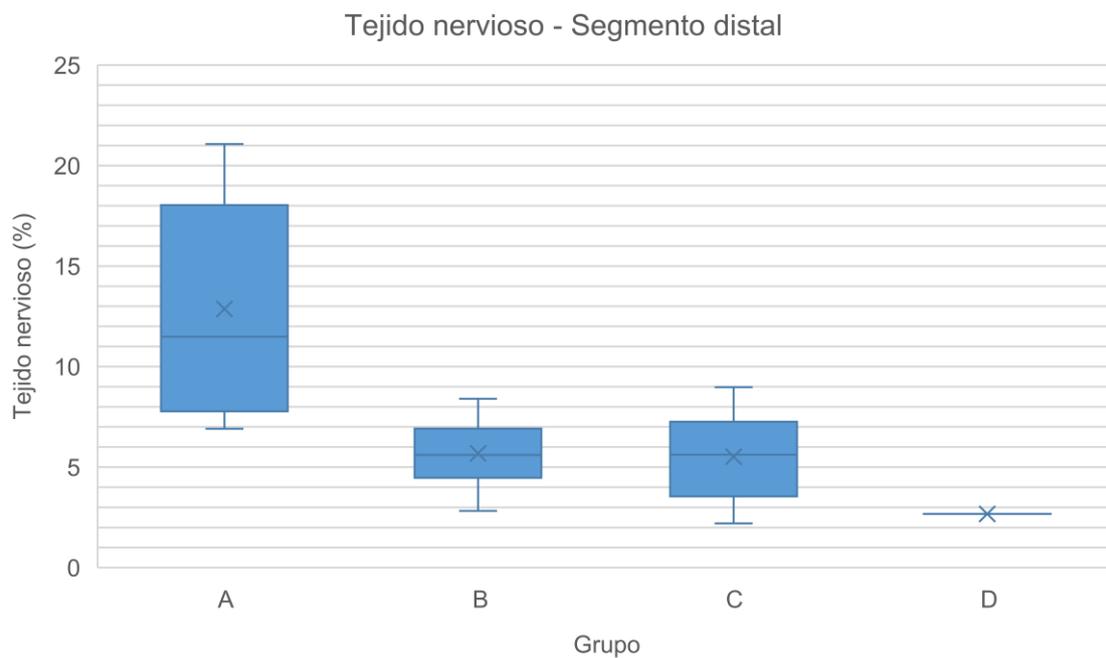
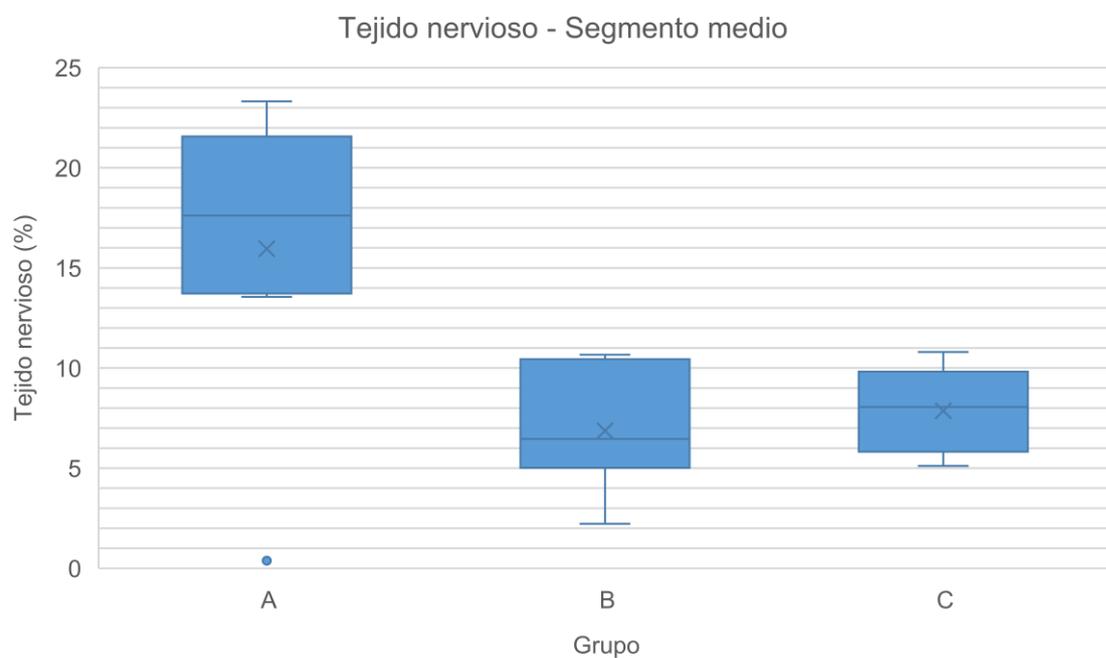


Gráfico 14. Diagrama de cajas que representa el porcentaje de tejido nervioso en el **segmento medio** de nervio ciático de cada grupo experimental (A-C).



El índice de regeneración es el cociente entre el número de axones del segmento distal y los axones del segmento proximal. Cuando es superior a 1, indica que hay mayor número de axones en el segmento distal que en el proximal. Cuando su valor es inferior a 1, el número de axones del segmento proximal supera al del segmento distal. En todos los grupos excepto en el D, se advirtió un rango que incluía al 1, esto es, que había animales con un índice de regeneración superior a 1 y otros con un índice inferior a 1 dentro de un mismo grupo experimental. Tras el contraste de hipótesis, no se encontraron diferencias significativas entre los grupos (p -valor = 0,512). En el caso concreto del grupo B, el tamaño muestral es de 6 para esta variable, pues una de las muestras del segmento proximal no fue apta para el recuento de axones.

Tabla 25. Índice de regeneración del nervio ciático en cada uno de los grupos experimentales

Grupo (N)	Mediana	Mínimo	Máximo	Media	Desviación típica
A (8)	0,80	0,48	2,35	1,00	0,60
B (6)	1,07	0,63	3,23	1,52	1,04
C (6)	0,92	0,36	2,18	1,06	0,63
D (2)	0,45	0,00	0,89	0,45	0,62

/ HISTOMORFOLOGÍA MUSCULAR

PESO MUSCULAR

Las tablas 26 y 27 expresan el peso muscular relativo del músculo tibial anterior y gastrocnemio medial en cada grupo. A continuación, se muestran también los diagramas de cajas correspondientes a cada una de las tablas (gráficos 15 y 16).

Tabla 26. Peso relativo (%) del músculo **gastrocnemio medial** derecho con respecto al izquierdo en cada uno de los cuatro grupos.

Grupo (n)	Mediana	Mínimo	Máximo	Media	Desviación estándar
A (8)	68,42	55,22	82,76	68,20	8,47
B (7)	50,00	39,39	57,53	58,14	5,83
C (8)	63,22	45,00	67,24	60,81	7,14
D (5)	16,95	11,94	34,69	19,44	8,80

Gráfico 15. Diagrama de cajas que representa el peso relativo (%) del músculo **gastrocnemio medial** derecho con respecto al izquierdo en cada grupo.

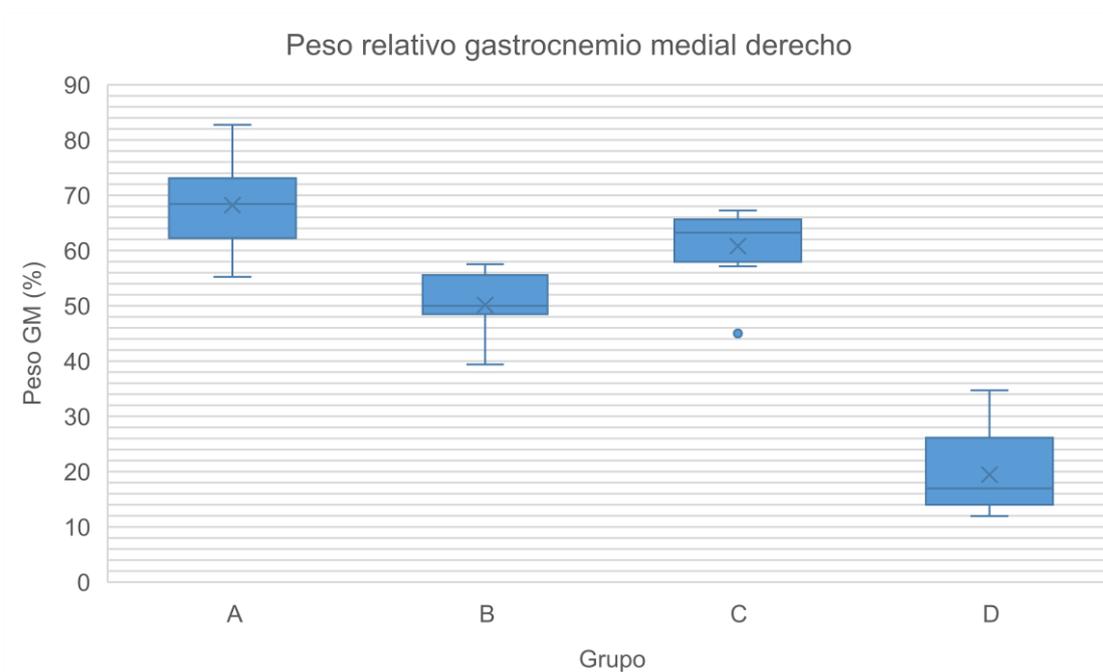
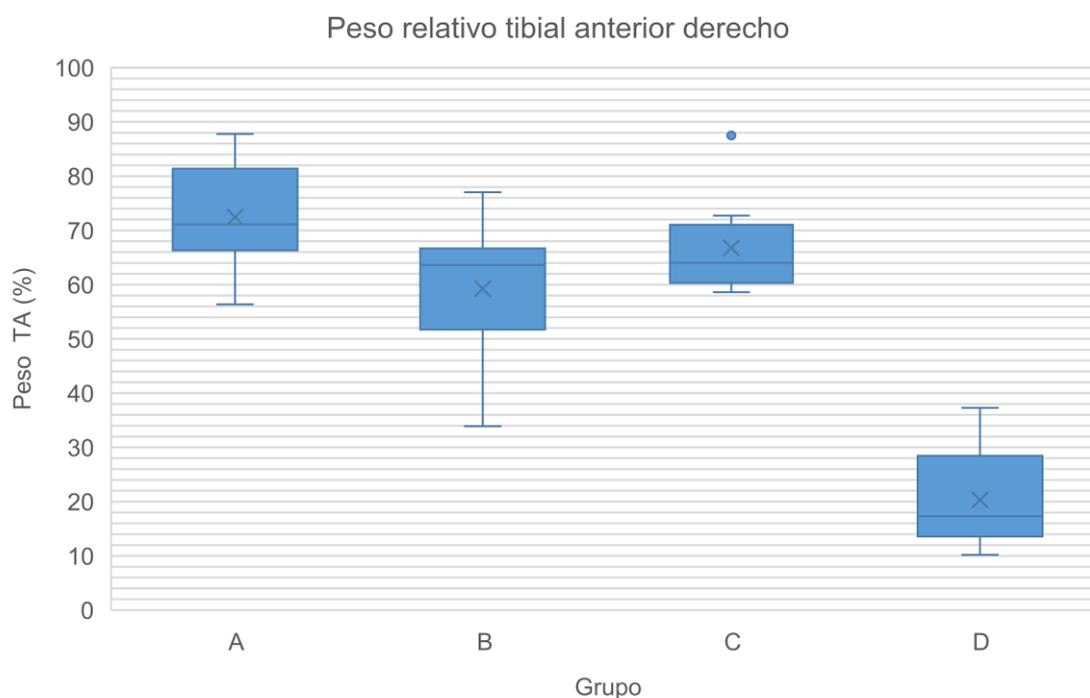


Tabla 27. Peso relativo (%) del músculo **tibial anterior** derecho con respecto al izquierdo en cada uno de los cuatro grupos.

Grupo (n)	Mediana	Rango	Máximo	Media	Desviación estándar
A (8)	71,10	56,36	87,76	72,44	9,92
B (7)	63,64	33,90	77,05	59,25	13,71
C (8)	64,02	58,62	87,50	66,77	9,45
D (5)	17,31	10,20	37,29	20,28	10,14

Gráfico 16. Diagrama de cajas que representa el peso relativo (%) del músculo **tibial anterior** derecho con respecto al izquierdo en cada grupo.



Tras realizarse el contraste de hipótesis y el ajuste para contrastes múltiples posterior, se observó que únicamente las diferencias en el peso relativo del gastrocnemio medial eran significativas. Concretamente, todos los contrastes entre dos grupos mostraron diferencias significativas en el peso relativo del gastrocnemio medial, excepto entre los grupos A y C que no diferían significativamente (Me A=68,42 % vs. Me C=63,22 %). En estos dos grupos, el peso relativo era significativamente mayor que

en el grupo B (Me B=50,00 %), que a su vez mostraba valores significativamente mayores que el grupo D (Me D=16,95 %) (tabla 26, gráfico 15).

Por otro lado, las diferencias de peso relativo de músculo tibial anterior entre los grupos no fueron significativas tras el ajuste de Holm-Bonferroni. No obstante, se puede observar como el gráfico sigue una tendencia similar a la del músculo gastrocnemio medial. Los valores del grupo A y del grupo C fueron los más elevados (Me A=71,10 %; Me C=64,02 %), seguidos del grupo B (Me B=63,64 %) y terminando con el grupo D (Me D=17,31 %), que tuvo los valores más bajos (tabla 27, gráfico 16). Tanto en el caso del gastrocnemio medial como del tibial anterior, el grupo C tratado con aloinjerto en fresco no presentó diferencias significativas con el grupo control positivo A.

Ilustración 40. Fotografía de músculo tibial anterior izquierdo (sano) en animal del grupo A en la semana 20.



Ilustración 41. Fotografía de músculo tibial anterior del lado derecho (a la derecha de la imagen) y del tibial anterior izquierdo (a la izquierda de la imagen) en un animal del grupo D en la semana 20.



Ilustración 42. Fotografía de músculo gastrocnemio medial derecho en animal del grupo A en la semana 20.



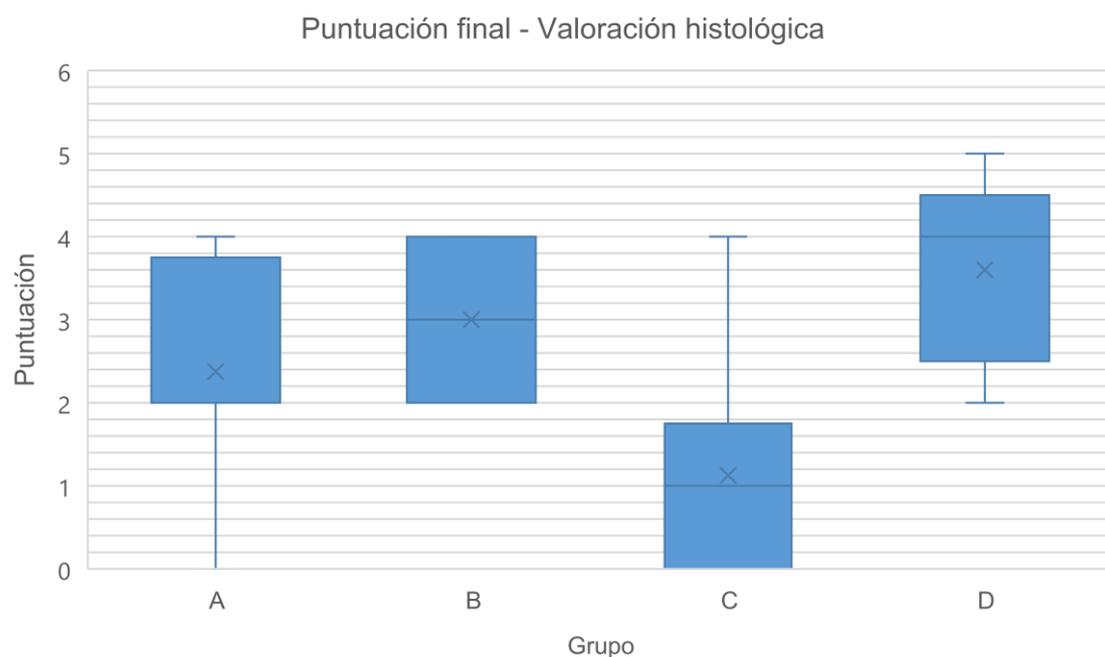
VALORACIÓN HISTOLÓGICA DEL MÚSCULO GASTROCNEMIO MEDIAL

Los resultados de la serie de análisis histológicos realizados sobre el músculo revelan que los animales del grupo C (Me=1,00; rango 0,00-4,00) fueron los que menor deterioro muscular sufrieron tras la sección y posterior reparación del nervio ciático según el sistema de clasificación definido previamente (tabla 28, gráfico 17). Los animales que obtuvieron la peor puntuación fueron los del grupo D (Me=4,00; rango 2,00-5,00). No obstante, las pruebas realizadas no detectaron diferencias significativas entre ninguno de los grupos con respecto a la puntuación final del músculo gastrocnemio medial.

Tabla 28. Puntuación final de cada grupo en la clasificación histológica del músculo gastrocnemio medial.

Grupo (n)	Mediana	Mínimo	Máximo	Media	Desviación estándar
A (8)	2,00	0,00	4,00	2,38	1,30
B (7)	3,00	2,00	4,00	3,00	0,82
C (8)	1,00	0,00	4,00	1,12	1,36
D (5)	4,00	2,00	5,00	3,60	1,14

Gráfico 17. Diagrama de cajas que representa la puntuación total en la clasificación histológica del músculo gastrocnemio medial derecho en cada grupo.



En la tabla 29 se descompone la puntuación final de la escala de valoración muscular en sus cuatro componentes. Cuando lo que se analiza es la cantidad de tejido muscular que presenta atrofia de fibras musculares, el grupo D mostró el mayor número de animales (80%, 14) con más de la mitad del tejido muscular con atrofia de fibras musculares, una frecuencia significativamente mayor (también tras el ajuste de Holm-Bonferroni) que la observada en el resto de los grupos (gráfico 18). La atrofia que presentaron los animales del grupo B fue mayor que la de los del grupo C (prueba Kuskal-Wallis $p=0,035$), pero la diferencia dejaba de ser significativa después del ajuste de Holm-Bonferroni. Igualmente, tanto el grupo B como el C no difirieron significativamente del grupo A.

Si se repara en el diámetro de las fibras musculares, medida indirecta del grado de atrofia de las fibras, todas las diferencias entre los grupos fueron significativas, también tras el ajuste de Holm-Bonferroni, excepto entre los grupos A y B (Me A=19,82 μm ; Me B=26,12 μm) (tabla 30, gráfico 22). En estos dos grupos, el diámetro de las fibras musculares es significativamente menor que el del grupo C (Me C=31,48 μm) y significativamente mayor que el del grupo D (Me D=10,72 μm).

La tabla 29 también resumía el resto de variables de la clasificación histológica muscular, destacando un mayor porcentaje de animales sin presencia de núcleos centrales en el grupo C en comparación con el grupo A de referencia (75,0% grupo C vs. 12,5% grupo A), pero sin alcanzar la significación estadística (ilustraciones 42-45, gráfico 19). En lo relativo al depósito de colágeno, tanto el grupo B como el D parecían tener mayor afectación, aunque ello no se tradujera en diferencias significativas (ilustraciones 46-49, gráfico 20). Finalmente, por lo que respecta al grado de infiltración grasa de los músculos, éste se mostró muy similar en los cuatro grupos (gráfico 21).

Tabla 29. Frecuencias relativas (%) y frecuencias absolutas (entre paréntesis) de las variables que conforman la clasificación histológica del músculo gastrocnemio medial. 0 = nada de tejido muscular afectado. 1 = $\leq 50\%$ tejido muscular afectado. 2 = $>50\%$ tejido muscular afectado. Con asterisco se destaca las diferencias que fueron estadísticamente significativas.

Variable		A	B	C	D
Atrofia fibras	0	12,5 (1)	0,0 (0)	50,0 (4)	0,0 (0)
	1	87,5 (7)	100,0 (7)	50,0 (4)	20,0 (1)*
	2	0,0 (0)	0,0 (0)	0,0 (0)	80,0 (4)*
Núcleos centrales	0	12,5 (1)	42,9 (3)	75,0 (6)	20,0 (1)
	1	87,5 (7)	57,1 (4)	25,0 (2)	80,0 (4)
	2	0,0 (0)	0,0 (0)	0,0 (0)	0,0 (0)
Colágeno	0	62,5 (5)	0,0 (0)	75,0 (6)	20,0 (1)
	1	37,5 (3)	100,0 (7)	25,0 (2)	80,0 (4)
	2	0,0 (0)	0,0 (0)	0,0 (0)	0,0 (0)
Grasa	0	75,0 (6)	57,1 (4)	87,5 (7)	80,0 (4)
	1	25,0 (2)	42,9 (3)	12,5 (1)	20,0 (1)
	2	0,0 (0)	0,0 (0)	0,0 (0)	0,0 (0)

Gráfico 18. Diagrama de barras que representa las frecuencias relativas y absolutas de animales con atrofia de fibras musculares en cada uno de los cuatro grupos A-D. La altura de la barra indica la frecuencia relativa representada en el eje vertical. En color verde aquellos que no presentaban atrofia (puntuación 0), en amarillo los que presentaban atrofia muscular en $\leq 50\%$ de su tejido (puntuación 1) y en rojo aquellos que tenían $>50\%$ de su tejido con atrofia de fibras (puntuación 2).

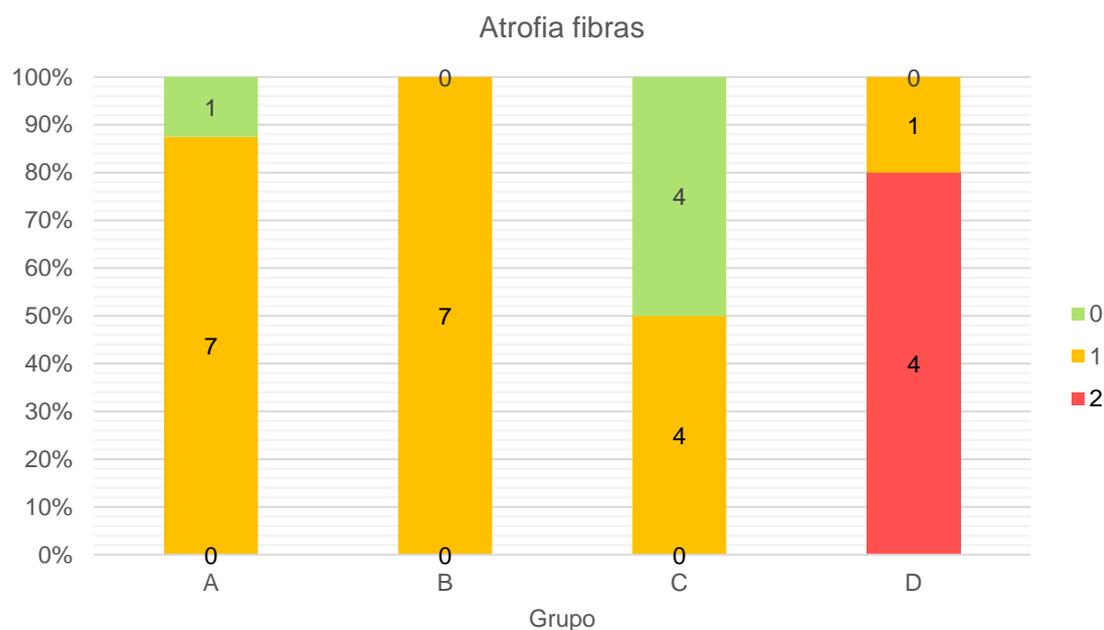


Gráfico 19. Diagrama de barras que representa las frecuencias relativas y absolutas de los animales de cada grupo A-D según la presencia de núcleos centrales en el músculo gastrocnemio medial derecho. La altura de la barra indica la frecuencia relativa representada en el eje vertical. En color verde aquellos que no presentaban núcleos centrales (puntuación 0), en amarillo los que presentaban núcleos centrales en $\leq 50\%$ de su músculo (puntuación 1) y en rojo aquellos que tenían $>50\%$ de su tejido muscular con núcleos centrales (puntuación 2).

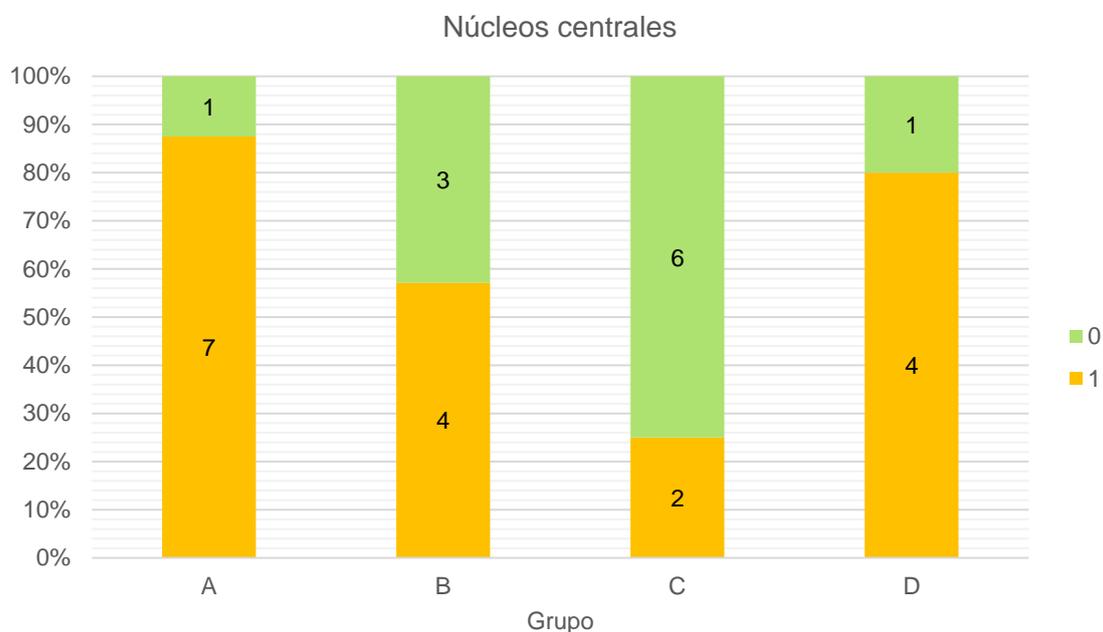


Gráfico 20. Diagrama de barras que representa las frecuencias relativas y absolutas de los animales de cada grupo según la cantidad de colágeno en el gastrocnemio medial derecho. La altura de la barra indica la frecuencia relativa representada en el eje vertical. En color verde aquellos que no presentaban colágeno (puntuación 0), en amarillo los que presentaban depósito de colágeno en $\leq 50\%$ de su tejido (puntuación 1) y en rojo aquellos que tenían $>50\%$ de su tejido con depósito de colágeno (puntuación 2).

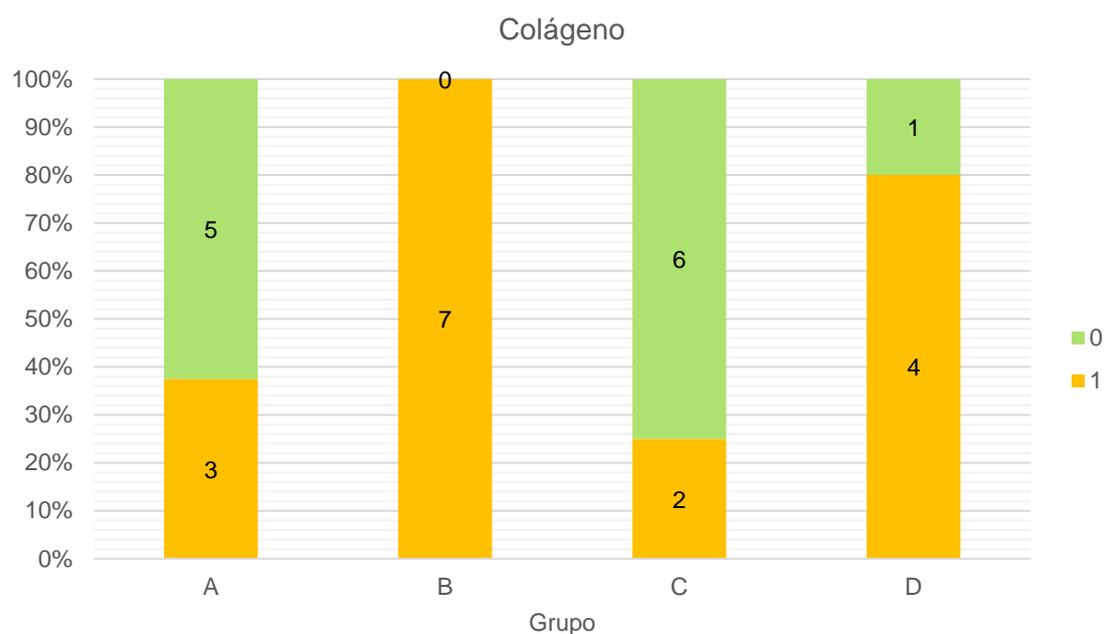


Gráfico 21. Diagrama de barras que representa las frecuencias relativas y absolutas de los animales de cada grupo según la infiltración grasa en el gastrocnemio medial derecho. La altura de la barra indica la frecuencia relativa representada en el eje vertical. En color verde aquellos que no presentaban infiltración grasa (puntuación 0), en amarillo los que presentaban infiltración de grasa en $\leq 50\%$ de su tejido muscular (puntuación 1) y en rojo aquellos que tenían $>50\%$ de su tejido muscular infiltrado de grasa (puntuación 2).

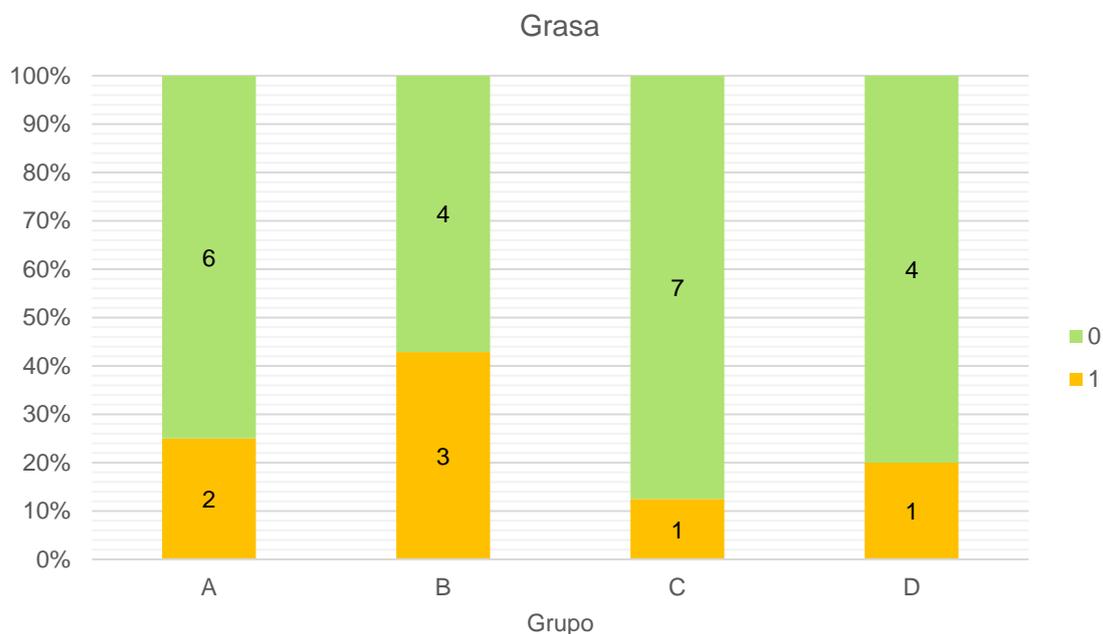


Tabla 30. Diámetro de las fibras musculares (μm) del músculo gastrocnemio medial derecho en cada grupo. Con asterisco se señalan los grupos que presentaron diferencias significativas con respecto al grupo control positivo (A).

Grupo (n)	Mediana	Mínimo	Máximo	Media	Desviación estándar
A (8)	19,82	18,24	33,44	21,94	5,22
B (7)	26,12	18,86	29,67	25,34	3,95
C (8)	31,48*	27,15	38,84	31,98	4,03
D (5)	10,72*	9,08	17,72	11,65	3,53

Gráfico 22. Diagrama de cajas que representa el diámetro de las fibras musculares (μm) del músculo gastrocnemio medial derecho en cada grupo.

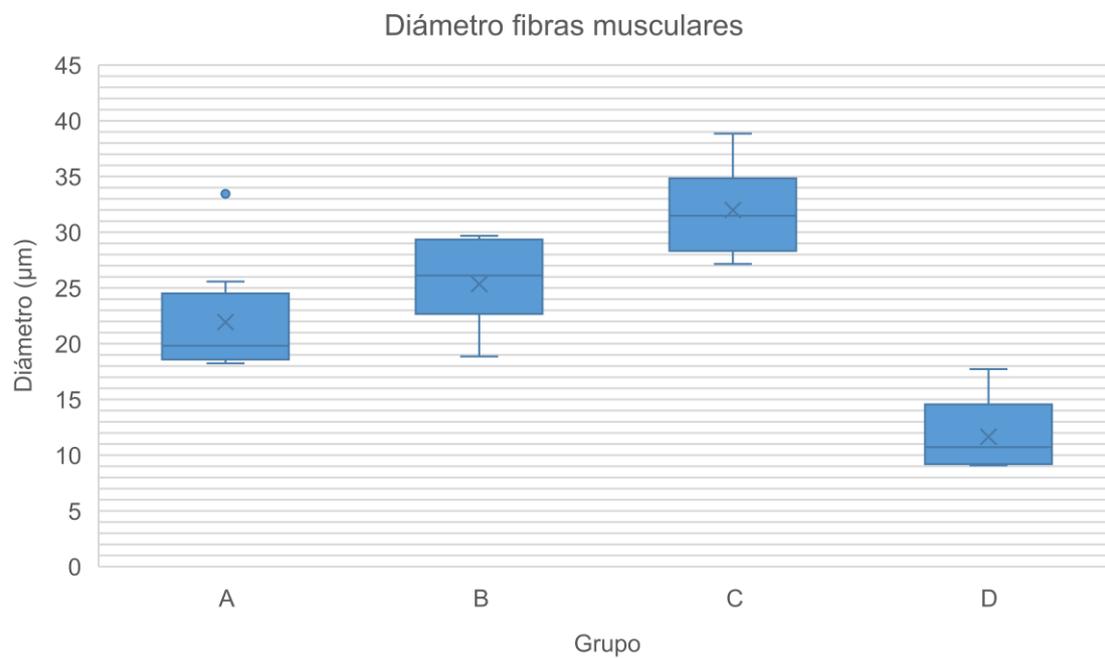


Ilustración 43. Corte transversal de músculo gastrocnemio medial izquierdo (izquierda de la imagen) y derecho (derecha de la imagen) de un animal del grupo A (rata A2) en la semana 20. Teñido con hematoxilina-eosina y visto en microscopio óptico a 200x.

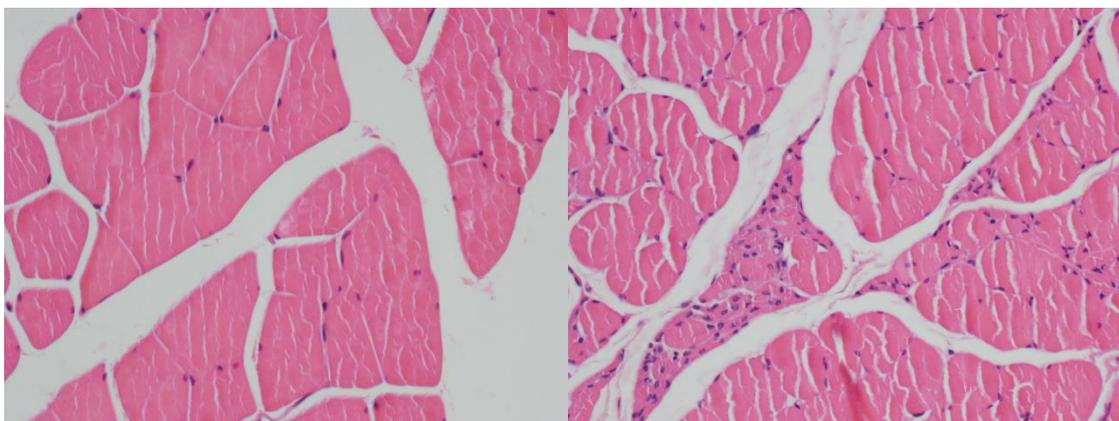


Ilustración 44. Corte transversal de músculo gastrocnemio medial izquierdo (izquierda de la imagen) y derecho (derecha de la imagen) de un animal del grupo B (rata K3) en la semana 20. Teñido con hematoxilina-eosina y visto en microscopio óptico a 200x.

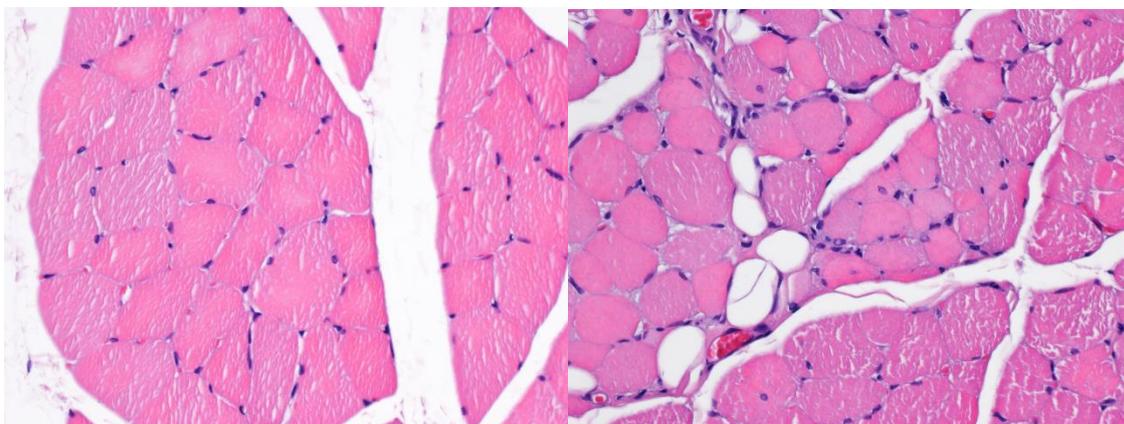


Ilustración 45. Corte transversal de músculo gastrocnemio medial izquierdo (izquierda de la imagen) y derecho (derecha de la imagen) de un animal del grupo C (rata J1) en la semana 20. Teñido con hematoxilina-eosina y visto en microscopio óptico a 200x.

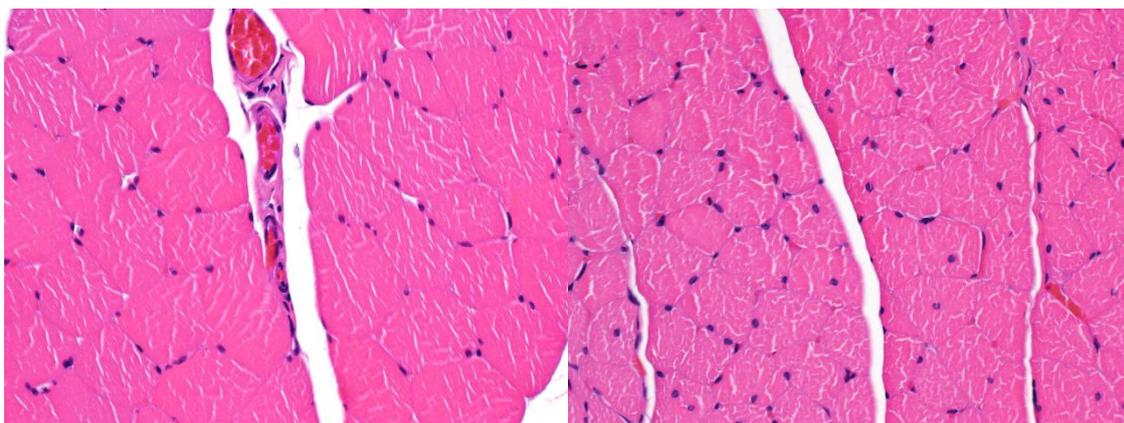


Ilustración 46. Corte transversal de músculo gastrocnemio medial izquierdo (izquierda de la imagen) y derecho (derecha de la imagen) de un animal del grupo D (rata C1) en la semana 20. Teñido con hematoxilina-eosina y visto en microscopio óptico a 200x. Se observan signos de atrofia muscular con células musculares más pequeñas y atrofiadas con formas angulares.

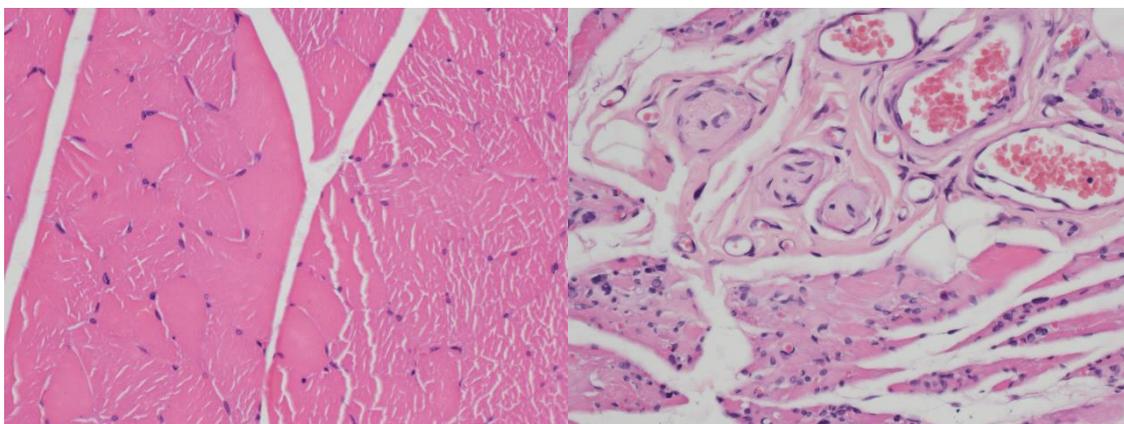


Ilustración 47. Corte transversal de músculo gastrocnemio medial izquierdo sano (izquierda de la imagen) y derecho (derecha de la imagen) de un animal del grupo A (rata A2) en la semana 20. Teñido con tricrómico de Gomori y visto en microscopio óptico a 200x.

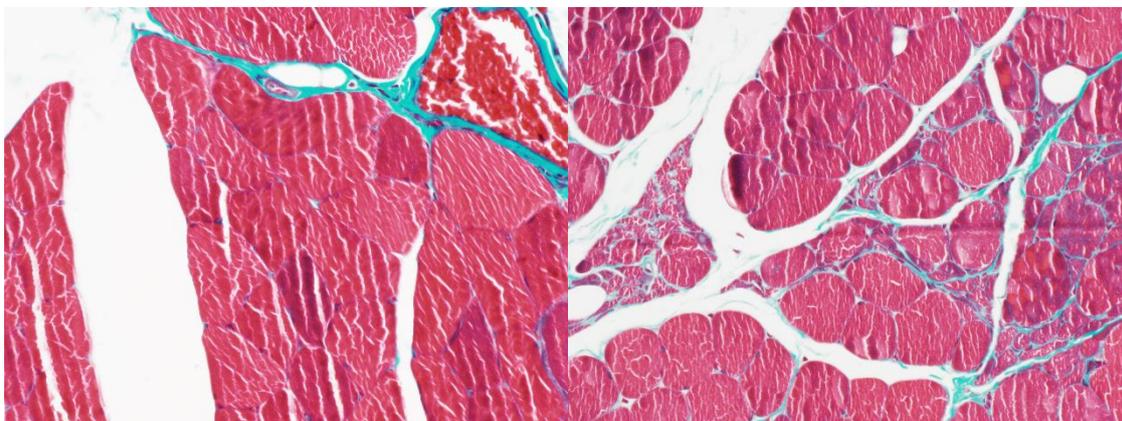


Ilustración 48. Corte transversal de músculo gastrocnemio medial izquierdo sano (izquierda de la imagen) y derecho (derecha de la imagen) de un animal del grupo B (rata K3) en la semana 20. Teñido con tricrómico de Gomori y visto en microscopio óptico a 200x.

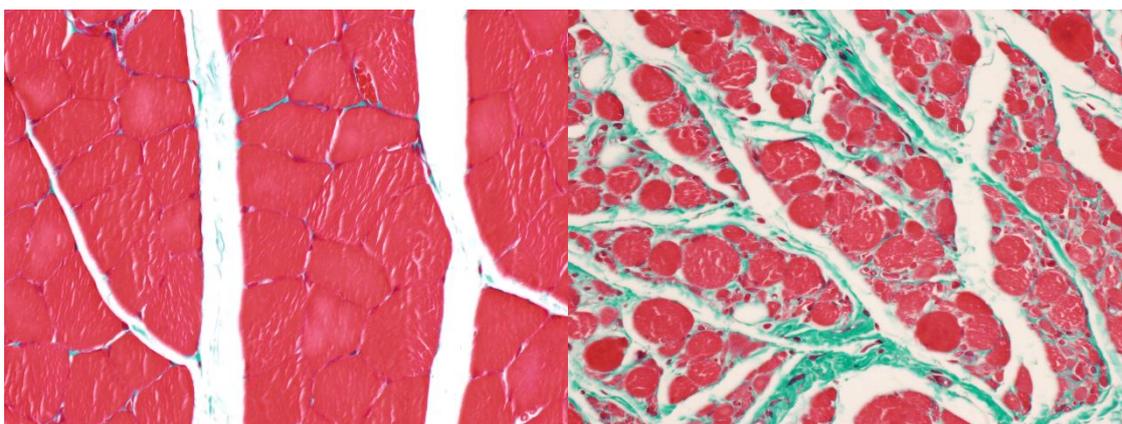


Ilustración 49. Corte transversal de músculo gastrocnemio medial izquierdo sano (izquierda de la imagen) y derecho (derecha de la imagen) de un animal del grupo C (rata J1) en la semana 20. Teñido con tricrómico de Gomori y visto en microscopio óptico a 200x.

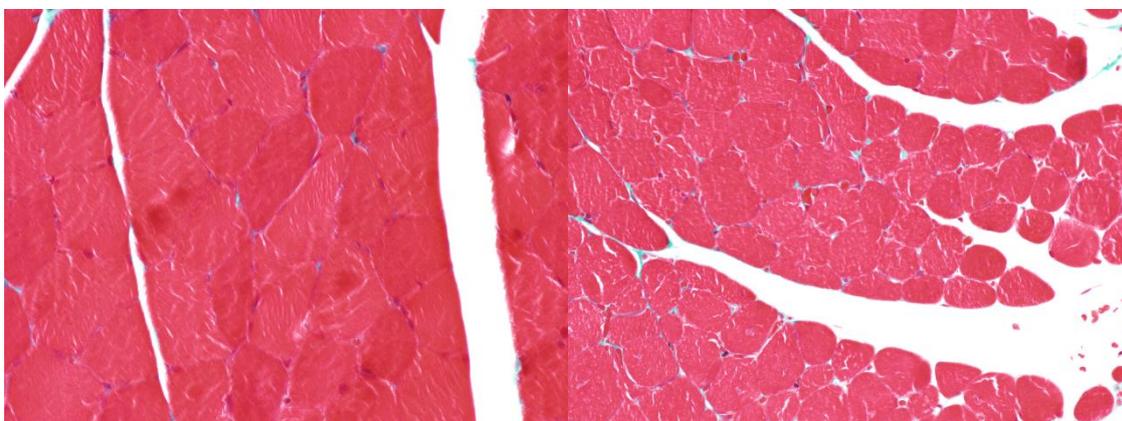
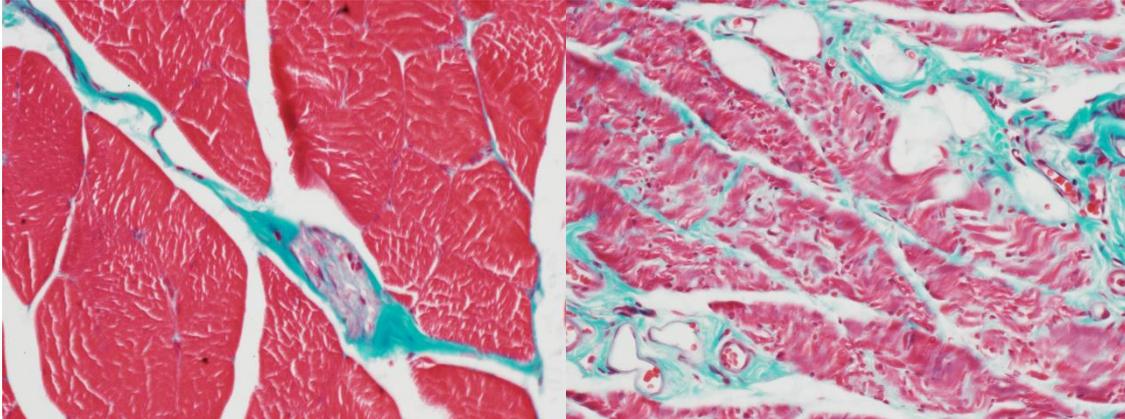


Ilustración 50. Corte transversal de músculo gastrocnemio medial izquierdo sano (izquierda de la imagen) y derecho (derecha de la imagen) de un animal del grupo D (rata C1) en la semana 20. Teñido con tricrómico de Gomori y visto en microscopio óptico a 200x.



5/ DISCUSIÓN

/ ANIMALES

/ PRUEBAS FUNCIONALES

/ HISTOMORFOLOGÍA DEL NERVIOS

/ HISTOMORFOLOGÍA MUSCULAR

5/ DISCUSIÓN

/ ANIMALES

En nuestro experimento no se observaron casos de autotomía de las extremidades intervenidas, uno de los principales problemas en este tipo de investigaciones y que puede comprometer la realización de pruebas funcionales. Para evitarlo, se aseguró una analgesia adecuada en todo momento y se seleccionaron ratas hembras, ya que la incidencia de automutilaciones en machos puede llegar a ser del doble que en las hembras (56). Asimismo, se seleccionó la cepa Wistar frente a otras alternativas como las Sprague-Dawley o Brown-Norway que suelen presentar comportamientos de automutilación más frecuentemente (57).

Por tanto, la elección del modelo animal con ratas de la cepa Wistar ha cumplido con su función: han resultado ser animales fáciles de manipular y estabular, disponibles en gran número y con fibras nerviosas muy similares en forma y tamaño a las de los seres humanos (44).

/ PRUEBAS FUNCIONALES

El objetivo principal de las variables de resultado es evaluar si ha habido regeneración de axones, si se han reinervado los órganos diana y si todo ello se traduce en una recuperación de las funciones del animal de experimentación. Para comenzar, mediante el análisis de la pisada y posterior cálculo de los índices funcionales y con la prueba del Rotarod se pretende valorar el grado de recuperación funcional.

En cuanto al análisis de la pisada, cuando se observan las huellas obtenidas en cada grupo experimental cabe destacar el predominio del talón en las pisadas seguido de la aducción de dedos, haciendo muy difícil la medición de la distancia entre el 2º y 5º dedo o entre el 1º y el 5º dedo en la mayoría de los casos. Este patrón se debe a una flexión dorsal del tobillo junto con la contractura de la musculatura intrínseca que produce una deformidad en garra de los dedos. Todas estas contracturas y alteraciones hacen muy difícil una adecuada medición de las distancias necesarias para el cálculo de los índices funcionales, tal y como advirtieron en sus artículos Dellon, Hare y Weber (56,58,59). No obstante, en el proyecto actual se consiguió medir todas las distancias

necesarias para calcular los índices funcionales a excepción de la distancia entre 2º y 5º dedo, que se sustituyó por los 6 mm convenidos.

El análisis de la pisada y cálculo posterior de los índices funcionales es la variable más utilizada para estimar la recuperación funcional tras lesiones de nervio ciático (19). En la literatura, diversos autores han destacado la falta de correlación entre los hallazgos histomorfológicos y los resultados funcionales medidos en forma de índices (55,60,61). Si bien es cierto que el índice funcional del nervio ciático tiene buena correlación con resultados histológicos en modelos animales de lesiones por aplastamiento del nervio ciático (*crush injury*), en los modelos en los que se utilizan injertos o conductos para reparar la lesión, la falta de correlación es más frecuente (56,58,62). Estudios previos realizados por el equipo de Tessa Gordon también señalan que, tras la sección y reparación del ciático, se produce la reinervación aberrante de músculos flexores y extensores, así como de las fibras sensitivas, lo que se traduce en una pobre recuperación de los índices funcionales (19). Pese a todo ello, se sigue considerando que los índices funcionales son una medida de la función alcanzada tras una reparación nerviosa y que representan la función global de la forma más parecida a lo que se pretende conseguir en la práctica clínica. Sin embargo, la ausencia de correlación con otras variables histológicas de estudio sugiere que éstas últimas podrían aportar información sobre el grado de regeneración axonal o de reinervación muscular, pero no informarían de la recuperación funcional (49).

Todos estos factores juntos podrían explicar la ausencia de diferencias significativas entre el grupo control positivo (grupo A) y los experimentales (grupos B y C) con respecto al grupo control negativo (grupo D) en el que no se utilizaron injertos para reparación nerviosa. Estos resultados coinciden con artículos previos en los que se utilizaba el mismo modelo animal. Constaba de tres grupos experimentales que tenían un defecto de nervio ciático de 14 mm reparado mediante autoinjerto, aloinjerto acelular o conducto de colágeno y en el que no se observaban diferencias en el SFI (*Sciatic functional index*, Índice funcional del ciático) calculado en la semana 12 (28). El tamaño muestral no excesivamente amplio de los grupos de nuestro estudio y, especialmente del grupo D, podría limitar la validez de este resultado. De hecho, el tamaño muestral está calculado para tener potencia a la hora de detectar diferencias en el número de axones y por esta razón podría ser insuficiente para desvelar diferencias en los índices funcionales. Tampoco se observaron diferencias entre los grupos experimentales y el grupo control, aportando cierta evidencia de que los aloinjertos

utilizados en este proyecto podrían obtener el mismo resultado funcional que los autoinjertos.

Teniendo en cuenta publicaciones anteriores, los resultados del SFI y del TFI (*Tibial functional index*, Índice funcional del tibial) deberían ser más parecidos entre sí que los del PFI (*Peroneal functional index*, Índice funcional del peroneo) y el SFI, puesto que el nervio tibial engloba una mezcla de fibras motoras y sensitivas mayor que el nervio peroneo y constituye un porcentaje mayor del total de fibras que conforman el nervio ciático. El menor valor del PFI frente al TFI se observa en todos los grupos a excepción del grupo A. Este dato podría explicar alguno de los resultados de las variables relativas a la musculatura, en las que la recuperación de la masa muscular relativa del músculo tibial anterior (dependiente del componente peroneal del nervio ciático) es ligeramente superior a la del músculo gastrocnemio medial (dependiente del componente tibial del nervio ciático) en todos los grupos.

En trabajos previos, Navarro *et al.* destaca la posibilidad de que, aunque se haya producido la regeneración axonal a través de los aloinjertos, la reinervación final del músculo sea imprecisa. Axones inervando simultáneamente músculos antagonistas, dirigiéndose a órganos diana diferentes de los originales o la poliinervación de la misma célula diana por distintos axones son escenarios que suceden con frecuencia en estos modelos animales y que podrían explicar los resultados inespecíficos obtenidos (63,64). La reinervación dirigida mediante injertos fasciculares o sustancias promotoras de la misma usando cámaras de trabajo no es posible en este tipo de experimentos. Asimismo, los axones regenerados se ramifican dentro de los músculos pudiendo inervar hasta 5 veces más fibras musculares de lo que lo harían en condiciones normales, derivando esto en una menor especificidad de función (19). Todo ello conlleva la denervación parcial de determinados músculos, parálisis asociada y contracturas articulares (58).

La falta de recuperación funcional que ponen de manifiesto los valores de los índices funcionales descritos en este trabajo es coherente con las recomendaciones de investigaciones previas. En ellas se enfatiza en la selección de los métodos de evaluación de la recuperación funcional en experimentos de regeneración nerviosa en animales (19,65). Si bien es cierto que se tuvieron en cuenta a la hora de diseñar este proyecto, el estudio de la conducción nerviosa *in situ* incrementa el coste del experimento, la morbilidad a los animales (se recomienda realizar la medición de forma

invasiva), no está exento de errores en la medición y dificulta la comparación posterior con numerosos estudios sobre regeneración nerviosa, ya que la mayoría seleccionaron los índices funcionales como una de las variables funcionales de resultado (44).

Una buena alternativa para superar alguna de estas limitaciones, si se quisiera estudiar la recuperación funcional de la extremidad inferior tras lesión de nervio periférico, sería escoger exclusivamente el nervio tibial a la hora de crear y reparar el defecto nervioso para disminuir la posibilidad de reinervación cruzada. Al conservar el nervio peroneo se mantendría la dorsiflexión del tobillo y se aseguraría que todas las pisadas son medibles (44).

Como se señaló al inicio de la sección, el Rotarod se ha utilizado como herramienta para valorar la recuperación funcional. Los mejores valores en el Rotarod los obtuvieron los animales tratados con aloinjertos acelulares frescos seguidos de aquellos en los que se aplicaron aloinjertos acelulares liofilizados. En tercer lugar, estaría el grupo correspondiente a los autoinjertos y en último, el grupo control negativo. Aunque las diferencias entre los grupos no alcanzaron significancia estadística, estos resultados podrían indicar la ausencia de diferencias en la recuperación de la función tras reparación con autoinjertos o aloinjertos acelulares, correspondiendo el peor resultado en el Rotarod a los animales del grupo control negativo (grupo D).

Sin embargo, no se observa correlación con las otras pruebas funcionales utilizadas (SFI, TFI, PFI), circunstancia que podría deberse a que el Rotarod estaría más enfocado a estudiar la coordinación motora y el equilibrio, funciones menos alteradas en las lesiones de nervio ciático (50,66). No obstante, es interesante observar que, en todos los grupos, los resultados alcanzados en el cuarto intento superaban a los obtenidos en el primer intento. Este dato justifica la necesidad de realizar un entrenamiento previo adecuado antes de realizar la prueba con el Rotarod para asegurarse una buena adaptación del animal al dispositivo. Hasta la fecha, no se ha encontrado ningún estudio sobre regeneración de nervio periférico con injertos que haya utilizado este sistema como método para evaluar la recuperación funcional de los animales. Pese a ello, podría considerarse una herramienta complementaria, ya que permite puntuar la función sensori-motora y la coordinación de una forma relativamente sencilla y no invasiva (65). A pesar de a la facilidad de utilización y disponibilidad de esta herramienta, antes de poder recomendar el uso del Rotarod para valorar la

recuperación funcional en lesiones de nervio periférico, este debería compararse explícitamente con los instrumentos utilizados y validados actualmente.

Otra explicación tentativa para la ausencia de diferencias significativas entre los grupos en los resultados observados en el Rotarod podría deberse al aumento de las unidades motoras que se produce tras el florecimiento colateral de nuevos axones al reparar el nervio ciático. La reparación de la lesión del nervio ciático conlleva el aumento del número de fibras musculares que está inervado por un único axón y que actúa como mecanismo compensador cuando se produce una lesión nerviosa. En condiciones normales, en las ratas maduras, el patrón de inervación es mononeuronal, cada fibra muscular está inervada por una única motoneurona (67). Tras la denervación y posterior reinervación, se produce el crecimiento colateral de los axones y se multiplica el tamaño de las unidades motoras entre 3 y 5 veces. En las ratas, este incremento compensador del tamaño de la unidad motora hace que el 30% de las unidades motoras sean capaces de inervar el músculo al completo y mantener la función motora (67,68). Por todo ello, es posible que no se hayan podido detectar diferencias significativas entre los grupos utilizando esta herramienta, ya que el mecanismo compensador descrito podría enmascararlas.

/ HISTOMORFOLOGÍA DEL NERVIO

Una de las mayores potencias del estudio radica en la minimización de los posibles sesgos en la cuantificación de las variables morfológicas del nervio. Al analizar cuantitativamente las fibras nerviosas, pueden aparecer al menos cinco fuentes de sesgo (69,70). La primera corresponde a la cepa, género y edad del animal escogido. Para eludir este sesgo, se utilizaron ratas de la misma cepa y del mismo rango de edad. El segundo sesgo estaría basado en la sección que se realiza en el nervio a analizar. En el proyecto, todos los nervios ciáticos se seccionaron a la misma altura y viene definida en el apartado de Material y Métodos. El tercero hace referencia a la localización de los campos de muestreo dentro de la sección del nervio analizado (sesgo de localización). El cuarto sesgo alude a los criterios de inclusión y exclusión para muestrear las fibras nerviosas (sesgo de morfología) y el quinto se refiere al método empleado para medir el valor de las variables seleccionadas (sesgo de medida). Estas tres últimas fuentes de sesgo están relacionadas con el muestreo y posterior medición

de las variables y deben ser controlados metodológicamente para minimizarlos. En el estudio realizado, se llevó a cabo un muestreo aleatorio de cada imagen para garantizar que todos los campos tuvieran la misma oportunidad de ser muestreados, que se distribuyeran sistemáticamente por toda la superficie del nervio muestreado sin depender de la subjetividad del investigador. De esta forma, se respeta la regla de la “igualdad de oportunidades” por la que todas las fibras deben tener la misma probabilidad de estar incluidas en la muestra (54). Para evitar la sobrestimación de las fibras y controlar el efecto de los bordes, se estableció que aquellas fibras incompletas del campo que tocaran los bordes inferior y derecho quedarían excluidas. Finalmente, para minimizar el sesgo morfológico se permitió el ajuste manual del recuento para excluir elementos contabilizados como fibras que no lo eran o para añadir fibras nerviosas no contabilizadas.

En lo que respecta al porcentaje de área muestreada, estudios anteriores hacen alusión a la necesidad de examinar morfológicamente un mínimo del 10% del área muestreada para evitar el sesgo de selección o muestreo (*sampling bias*) (46,71,72). En los resultados obtenidos, todos los segmentos medio y distal de nervio ciático muestreados permitieron analizar, como mínimo, el 10% del área total muestreada y, en la mayoría de los casos, el 25%. Otros estudios expresan el número de campos analizados sin detallar el área a la que corresponden, por lo que es imposible saber cuán representativos serán los resultados obtenidos (73).

La falta de tejido para analizar en el segmento distal de los animales del grupo control negativo (grupo D) implica la ausencia de regeneración nerviosa. Hay dos casos de animales del grupo D en los que sí se obtuvo una muestra mínima en el segmento medio, pero esta no tuvo continuidad en el segmento distal.

A la hora de interpretar los resultados, es importante tener en cuenta que en este estudio solo se ha utilizado el microscopio óptico para el análisis histomorfológico y no el electrónico. Tal y como sugiere Ronchi *et al.*, esto puede infraestimar en número las fibras nerviosas de menos de 2 μm y, por ende, al no contabilizar las fibras más pequeñas, sobreestimar las variables referentes al tamaño medio de las mismas (73).

En 2008 Brenner ya alertaba de la alta probabilidad de incurrir en errores de tipo II al utilizar modelos experimentales con roedores (74). En este trabajo se ponía de manifiesto la importancia de escoger el momento temporal para realizar el análisis histológico y funcional de los nervios en función del tipo y tamaño del defecto creado.

La razón es que, debido a la enorme capacidad de regeneración de los roedores, la elección de un punto final demasiado largo puede hacer que no se detecten diferencias que de haber seleccionado un punto final previo sí se habrían detectado. No obstante, el punto final óptimo para detectar diferencias en las variables histológicas del nervio y las funcionales o histológicas de los órganos diana difiere entre sí. De hecho, las 20 semanas escogidas en el trabajo aquí descrito suponen un punto intermedio entre lo que se podría considerar óptimo para un defecto de 14 mm desde el punto de vista de la regeneración axonal y la recuperación funcional, que siempre requiere de más tiempo. Estudios previos demuestran que la capacidad teórica de regeneración nerviosa de los animales es de 3 mm/día en condiciones ideales (disminuyendo esta capacidad con la edad, el tamaño del defecto, el tipo de lesión y el tiempo de evolución) y que el frente de regeneración supera el punto de reparación de forma escalonada requiriendo 4 semanas para completarlo (19,75). Teóricamente, los animales del experimento actual necesitarían 8 semanas para superar los dos puntos de sutura del injerto (proximal y distal) y 4,7 días para crecer a lo largo de los 14 mm de defecto nervioso. Esto supone un total de casi 9 semanas para que los axones regenerados lleguen al cabo distal. Posteriormente, puesto que no sólo se pretende analizar la regeneración nerviosa sino también la recuperación funcional, se necesita más tiempo para que esos axones regenerados alcancen sus órganos diana y los reinerven de forma efectiva.

Recapitulando los resultados obtenidos referentes a las variables histomorfológicas del nervio, tanto los aloinjertos descelularizados liofilizados como los conservados en fresco permitieron el crecimiento de un número de axones que no mostraba diferencias estadísticamente significativas con el número de axones obtenido al reparar el defecto con autoinjerto. Igualmente, los datos de este estudio muestran que los aloinjertos procesados y descelularizados promueven mayor crecimiento y regeneración axonal que los tubos de silicona vacíos. La falta de regeneración a través de los conductos era un resultado esperable teniendo en cuenta el tamaño del defecto y el microambiente creado por el tubo. Concretamente, la literatura señala que los tubos de silicona no son capaces de permitir la regeneración axonal en defectos de más de 10 mm (76,77). La ausencia de regeneración en este caso confirma que los conductos de silicona actúan como un grupo control negativo y demuestran que la regeneración observada en el resto de los grupos experimentales no se debe a la regeneración espontánea que puede haberse visto en otros modelos experimentales con roedores (74).

El trabajo de Moore *et al.*, con un diseño similar al presente en este trabajo, mostraba cifras de axones similares en los que los aloinjertos descelularizados mediante detergentes (n axones = 5.333 ± 3.613), de forma análoga a como se ha realizado en este trabajo, conseguían un número de axones en el segmento distal similar a los autoinjertos (n axones = 6.331 ± 2.251) y superiores al número de axones obtenido al utilizar aloinjertos descelularizados mediante el protocolo realizado por AxoGen® (*Avance nerve grafts*. AxoGen, Inc., Alachua, Florida) (n axones = 2.717 ± 2.468) o utilizando el frío como método de procesamiento (n axones = 1.597 ± 1.193) (20,28).

Por otro lado, los resultados del estudio presente diferían de los encontrados por Tang *et al.*, que describían unos valores de número de axones en segmento distal de 9.434 ± 974 para los aloinjertos procesados mediante detergente tipo AxoGen® y de 12.557 ± 2.169 para aquellos animales tratados mediante autoinjerto. Tampoco ellos encontraron diferencias estadísticamente significativas entre ambos. La gran diferencia con respecto a los valores en el número de axones del trabajo de Tang podrían deberse a varios factores: mayor peso de los animales utilizados y defecto nervioso más corto (10 mm) (78). Los resultados de Tang son similares a los presentados por Whitlock *et al.*, que mostraba cifras de alrededor de 10.000 axones presentes en el segmento distal del nervio ciático tras la reparación de un defecto de 14 mm a las 12 semanas, sin diferencias entre los distintos grupos: autoinjerto, aloinjerto descelularizado tipo AxoGen® y conducto de colágeno (NeuraGen®) (28). En este último caso, los animales utilizados fueron ratas macho Brown-Norway de las que no se detalla su peso al inicio o al final del experimento, por lo que es difícil poder comparar sus resultados en términos absolutos de número de axones con los propios.

Un hallazgo inesperado fue que el número de axones del segmento medio de los animales tratados con autoinjertos nerviosos (grupo A) prácticamente duplicaba al número de axones del segmento distal, indicando un probable crecimiento aberrante (79). Esta situación también se observaba, aunque en menor medida, en los animales del grupo de aloinjertos acelulares frescos (grupo C), pero no afectó a los tratados con aloinjertos acelulares liofilizados (grupo B).

El número de axones es la variable más utilizada para medir el éxito de la regeneración nerviosa, tanto en estudios que valoran la reparación directa como en aquellos que evalúan la utilidad de injertos o conductos (19,80). Sin embargo, a pesar de ser la medida más utilizada, no se debe obviar que tras la sección del nervio ciático

se produce un fenómeno de regeneración axonal aleatoria en la que las motoneuronas son capaces de generar hasta 3 axones por cada una de ellas y las sensitivas el doble (81). Por tanto, aunque es la medida más utilizada en los estudios sobre lesión tipo sección y reparación de nervio ciático, la correlación entre el número de neuronas y el número de axones regenerados aportaría más información sobre si el método de reparación utilizado afecta al número de neuronas o sólo estimula el florecimiento colateral de muchos axones desde una misma neurona. No obstante, el objetivo del estudio es valorar si los injertos permiten la regeneración de esos axones a través de ellos y de si estos últimos, al llegar a los órganos diana, son suficientes en número y madurez para poder conseguir la recuperación funcional.

En la literatura se expone que, tras una sección y posterior reparación del nervio ciático, se produce la proliferación de más de un axón por cada motoneurona y, por tanto, un número reducido de motoneuronas con sus axones regenerados puede llegar a reinervar de forma suficiente las fibras musculares del órgano diana y obtener valores normales de fuerza de contracción muscular. Hay estudios que hablan de un aumento de las unidades motoras, esto es, mayor número de fibras musculares inervadas por un mismo axón hasta un límite de 3-5 veces en las ratas. Si se extrapolan estos datos y se aplican al estudio, podría ser que sólo con una quinta parte de las unidades motoras se pueda conseguir una recuperación funcional normal (67,68).

En el caso de la densidad de fibras nerviosas (número de axones/100 μm^2), esta es una variable más objetiva a la hora de comparar los resultados entre estudios, ya que elimina la influencia que puede tener el tamaño del animal de experimentación y el diámetro completo del nervio analizado a la hora de valorar el número de axones. Como es lógico, en el estudio presenta un resultado similar al del número de axones normalizado, sin diferencias significativas entre los defectos reparados con autoinjertos o aloinjertos.

Si retomamos los resultados obtenidos por Moore *et al.*, cuando lo que se valora es la densidad de fibras nerviosas, las diferencias entre los cuatro grupos que sí se observaban al valorar el número de axones absoluto, dejaron de ser significativas estadísticamente (autoinjerto, aloinjerto descelularizado con detergente, aloinjerto descelularizado método AxoGen®, aloinjerto descelularizado con frío) (20).

Volviendo a las características morfológicas de las fibras nerviosas, el diámetro del axón (μm), el espesor de la vaina de mielina (μm) y el área del axón (μm^2) son

medidas de la madurez de las fibras mielínicas. En el estudio actual, no se detectaron diferencias estadísticamente significativas en el tamaño de los axones, pese a ser éste mayor en los animales tratados con autoinjertos. Se observó también que los axones del segmento medio eran más grandes que los del segmento distal, probablemente porque a medida que los axones se desplazan hacia las zonas más distales y se ramifican suelen ir disminuyendo su calibre.

Generalmente se acepta que cuando se toma el diámetro mínimo del axón como referencia para establecer el diámetro del mismo se incurre en una infraestimación debido a la retracción de las fibras en el procesamiento de las muestras (70,80). Esto podría justificar los valores ligeramente inferiores que se presentan en este trabajo comparados con los de la literatura previa (20). Otro factor que también podría influir en el diámetro de los axones es el tiempo, pues el diámetro de los axones regenerados aumenta con el paso del tiempo y con el crecimiento y maduración de los animales (80,82).

Tal y como sucedía con el diámetro de los axones, los tres grupos experimentales mostraron axones con áreas que no llegaron a alcanzar diferencias estadísticamente significativas entre ellos. Aunque sí se observa que los valores de los animales del grupo tratado con autoinjertos fueron superiores a los del grupo de aloinjertos frescos y éstos superiores a los del grupo de aloinjertos liofilizados. Estos datos deben ser interpretados con cautela, pero probablemente el hecho de preservar los aloinjertos descelularizados en fresco (grupo C) y reducir los tiempos de procesamiento con respecto a los aloinjertos liofilizados (grupo B) influye en la conservación de factores de crecimiento en el tejido descelularizado y, por ende, podría influir en la madurez alcanzada por los axones regenerados (83,84).

Como se mencionó anteriormente, el comportamiento del espesor de la vaina de mielina es comparable al del diámetro o área del axón. No se observaron diferencias estadísticamente significativas entre los axones regenerados a través de los autoinjertos o aloinjertos procesados. Existe un paralelismo entre el comportamiento de estas tres variables referentes a la madurez de los axones y que, en los tres casos, alcanzan valores de aproximadamente un tercio de los valores presentes en un nervio ciático de rata íntegro (tabla 12 en Resultados). Estos hallazgos parecen apoyar la idea de que la mielinización de los axones regenerados en el segmento distal del nervio reparado es un proceso largo y continuado que puede tardar años en normalizarse (19,85).

Como ya se apuntó previamente en el número de axones normalizado y la densidad de fibras nerviosas, el porcentaje de tejido nervioso también demostró que tanto los autoinjertos como los aloinjertos descelularizados (grupo B y C) permitían la regeneración de los axones a lo largo del defecto creado en el nervio ciático. Aunque en este caso no se observaran diferencias significativas, el porcentaje de tejido de los animales del grupo tratado con autoinjerto (Me A=11,49 %) fue de más del doble que el de los animales tratados con aloinjertos procesados (Me B=5,61 %; Me C=5,62 %;). Los valores son similares a los obtenidos en estudios previos y coherentes con el resto de resultados obtenidos (20).

Para finalizar y, contrariamente a lo que cabría esperar tras una lesión y reparación de nervio ciático en ratas, el índice de regeneración de los grupos no ha sido superior a 1. En todos los grupos el rango incluye el valor 1, lo que indica que hay animales en los que el número de axones distales supera a los proximales y otros en los que esto sucede a la inversa. Si atendemos a la bibliografía, tras una sección y posterior reparación del nervio ciático de ratas mediante injertos, se produce la proliferación colateral de axones a partir de una misma neurona, lo que ocasiona un aumento del número de axones en el segmento distal con respecto al proximal, aunque estos sean de menor calibre o más inmaduros (80). Posteriormente, a lo largo de su crecimiento a través de los injertos, los axones que se dirigen a dianas erróneas podrían interrumpir su avance o desviarse y no terminar superando la sutura distal, justificando un índice de regeneración inferior a 1 (80).

/ HISTOMORFOLOGÍA MUSCULAR

El peso de los músculos distales a un nervio lesionado y posteriormente reparado se considera proporcional al grado de reinervación del músculo. Dado que los músculos denervados sufren una atrofia progresiva, esta es una variable que indica la llegada del frente de regeneración a los órganos diana (65).

En los resultados de nuestro estudio para el músculo gastrocnemio medial, tanto los animales tratados con autoinjerto (grupo A) como los tratados con aloinjertos acelulares frescos (grupo C) (Me A=68,42 % vs. Me C=63,22 %) no mostraron diferencias significativas entre sí y fueron significativamente superiores a los tratados mediante aloinjertos acelulares liofilizados (grupo B) (Me B=50,00 %) y a los animales

del grupo D (Me D=16,95 %). Whitlock *et al.* publicaron en 2009 sus resultados con respecto a la masa muscular relativa del músculo gastrocnemio sin encontrar diferencias significativas entre los grupos a los que trataban un defecto de 14 mm en el nervio ciático con autoinjerto ($0,4 \pm 0,06$; n=4), aloinjerto ($0,34 \pm 0,06$; n=4) o conducto de colágeno ($0,36 \pm 0,04$; n=5) (28). Es posible que la diferencia de 8 semanas (el punto final de Whitlock fue la semana 12) entre la medición del peso muscular que se hace en el estudio comentado y en este presente justifique la recuperación de casi el doble de la masa muscular que se exhibe en nuestros resultados. Resultados similares a los obtenidos en este experimento obtuvieron otros autores como Tang, en los que el peso relativo del tibial anterior estaba entre el 47,5 % y el 52,0%, sin diferencias estadísticamente significativas entre grupos (78). El trabajo de Moore *et al.* tampoco encontró diferencias significativas entre los grupos experimentales, con valores de peso relativo del músculo *extensor digitorum longus* (EDL) en la semana 16 de 83,75% para el grupo de autoinjerto, 71,95% para los animales tratados con aloinjertos procesados mediante detergentes, 73,13% para los aloinjertos descelularizados con frío y de 57,57% para los aloinjertos descelularizados según AxoGen®. Para los animales del grupo control negativo el peso relativo del EDL fue de 17,59%, muy similar al resultado obtenido en nuestro trabajo para el grupo control negativo (conducto de silicona).

Además, en los resultados del experimento actual se observa que el peso relativo del músculo tibial anterior alcanza valores superiores a los del músculo gastrocnemio medial en todos los grupos. Estos datos podrían sugerir la menor afectación del componente peroneo con respecto al tibial en las lesiones del nervio ciático o una menor incidencia de reinervación cruzada en el nervio peroneo.

Estos resultados reafirman que, aunque se pueda recuperar la masa muscular, la función motora global e integrada que se cuantifica con otras variables como los índices funcionales derivados del análisis de la pisada o el Rotarod se ve alterada a pesar de hacer una reparación inmediata del defecto nervioso y pese a haber regeneración axonal suficiente (47,59,86,87).

Una vez valorado el peso relativo muscular, a continuación se discute la recuperación histológica del músculo gastrocnemio medial reinervado. Los animales tratados con aloinjertos acelulares conservados en fresco fueron los que mejor puntuación obtuvieron en la escala de valoración histológica muscular, seguidos de los animales tratados con autoinjertos y aloinjertos procesados liofilizados y terminando con

los animales del grupo control negativo, que obtuvieron la peor puntuación. Pese a no observarse diferencias estadísticamente significativas en la puntuación global, los resultados sí revelaron diferencias en cuanto al grado de atrofia de las fibras musculares y su diámetro. El diámetro de las fibras de los animales tratados con aloinjerto acelular en fresco (grupo C) fue significativamente mayor que el de los animales tratados con autoinjerto o aloinjerto acelular liofilizado, que no diferían entre ellos en el diámetro de sus fibras. Los tres grupos presentaron diámetros superiores a los observados en las fibras de los animales del grupo control negativo (grupo D). Este resultado es consistente con el grado de atrofia observado en las muestras histológicas, en las que el grupo D presentó una proporción de animales con atrofia de fibras en >50% de su tejido significativamente mayor que la observada en el resto de los grupos.

Por lo que respecta al resto de variables consideradas en la clasificación histológica muscular, los datos muestran que lo más destacado es la atrofia de las fibras musculares. Seguidamente se produciría el depósito de colágeno, presente en menor porcentaje de tejido muscular y, para terminar, la infiltración grasa, que está prácticamente ausente en todos los grupos. Es interesante observar que, tal y como señalaba Aird *et al.*, la atrofia muscular precede al depósito de colágeno en el músculo y es el principal factor predisponente para la fibrosis muscular. En el estudio actual se pone de manifiesto esta premisa, pues la atrofia de las fibras musculares afecta a más animales dentro de cada grupo que el depósito de colágeno en el músculo, que podría comenzar a acumularse de forma temprana tan sólo 3 meses después de la denervación (88).

Para sintetizar, la capacidad de regeneración de los aloinjertos acelulares se ha evaluado analizando la regeneración axonal y la recuperación funcional tras la reparación nerviosa. La histomorfología del nervio se ha utilizado para estudiar la regeneración aguda de los axones a través de los injertos o conductos empleados. Seguidamente, el estudio de los índices funcionales, así como de los músculos ha permitido conocer los efectos funcionales crónicos de la denervación-reinervación.

Los aloinjertos acelulares han demostrado que permiten la adecuada regeneración axonal de defectos mixtos de 14 mm de forma similar al *gold* estándar actual (autoinjertos) y de forma superior a la permitida a través de los tubos de silicona. Los resultados también sugieren que los métodos de procesamiento de los nervios pueden influir en sus propiedades regenerativas y, sobre todo, en la recuperación

funcional que promueven. Los resultados histológicos del nervio no muestran diferencias significativas entre los grupos, pero la recuperación funcional a nivel histológico muscular parece superior en los animales tratados con aloinjertos acelulares preservados en fresco. Parece coherente que no se hayan encontrado diferencias significativas en el grado de regeneración axonal soportado por las dos modalidades de aloinjertos o con los aloinjertos y el autoinjerto. El método de descelularización de los aloinjertos es el mismo en ambos casos y sólo difieren en el último paso, relativo a su método de conservación. Por los resultados cosechados, este último paso tendría consecuencias únicamente en el plano de la recuperación funcional evidenciado en las diferencias observadas a nivel muscular. Hudson *et al.* ya depuró el método de descelularización y el presente estudio no ha hecho más que terminar de optimizarlo, por lo que se obvia la necesidad de comparar este método de descelularización con otros alternativos que ya han demostrado ser inferiores en cuanto a regeneración axonal y recuperación funcional se refiere (20,24). Es posible que la superioridad de los aloinjertos acelulares preservados en fresco con respecto a los liofilizados pueda deberse a que este último paso de liofilización ocasione la pérdida de determinados factores de crecimiento o propiedades constitutivas del injerto que disminuyan su eficacia. Cualquier paso adicional en el tratamiento de los nervios parece incrementar la pérdida de propiedades inherentes del nervio y disminuir su potencial regenerativo. Estos datos deberán tenerse en cuenta si el objetivo final es trasladar la aplicación del protocolo de descelularización a la práctica clínica en pacientes.

La principal limitación de este estudio es no haber comparado los aloinjertos acelulares procesados mediante detergentes con los aloinjertos de AxoGen® comercializados en la actualidad. Esta limitación podría haberse salvado utilizando aloinjertos preservados en frío, tal y como sugería en su discusión Moore *et al.*, pues estos se habían comportado de forma análoga a los de AxoGen® y constituían una buena alternativa para ahorrarse el coste de su inclusión en los experimentos (20).

Aunque el estudio ha demostrado con éxito que los aloinjertos acelulares procesados mediante el protocolo propuesto permiten la regeneración axonal y la recuperación funcional de forma similar a lo conseguido mediante autoinjertos, tiene ciertas limitaciones en términos metodológicos. Si bien es cierto que la mayoría de los estudios de regeneración de nervio ciático en ratas lo obvian, el marcaje retrógrado de las motoneuronas permitiría contar el número de neuronas que se regeneran a través del injerto nervioso y definir de forma más precisa cómo transcurre la regeneración

axonal en cada caso (19,43,80). Asimismo, las pruebas funcionales utilizadas son las más prevalentes en la literatura, pero no por ello estarían exentas de sesgos y su interpretación debe hacerse en el contexto del objetivo del estudio. La valoración mediante electrofisiología de la función muscular o el análisis visual mediante programas informáticos de la marcha de los animales proporciona información mucho más precisa de la reinervación funcional alcanzada tras la reparación del nervio ciático, pero el incremento del coste y duración del experimento que supone se consideró excesivo para los objetivos planteados al inicio del estudio (19,62).

No obstante, y pese a las limitaciones enunciadas, la metodología descrita para la valoración histomorfológica del nervio ciático queda minuciosamente reflejada en el estudio y garantiza su reproducibilidad. El control de los sesgos en la obtención y posterior análisis de las secciones de los nervios obtenidos es fundamental para poder comparar los resultados entre grupos y con otros estudios similares. Lamentablemente, existen numerosos estudios sobre regeneración nerviosa que obvian dicha descripción o que no controlan los sesgos de selección o la regla de igualdad de oportunidades y que obligan a interpretar con cautela sus resultados (46,54,71,72)

Tal y como ya sugerían Moore y Hudson hace años y con el objetivo de aplicar estos resultados a la práctica clínica en humanos, todos los mecanismos de procesamiento de nervios deben optimizarse para su uso en humanos (20,24). Con ese objetivo en el horizonte y tras la confirmación de que el método desarrollado permite la regeneración axonal y la recuperación funcional de forma similar o incluso superior a los autoinjertos, se puede acoplar y adaptar el protocolo de descelularización a la naturaleza de los nervios humanos.

Investigaciones futuras deberán estudiar si la capacidad de regeneración de los aloinjertos acelulares se mantendrá en defectos superiores a los 14 mm evaluados en este trabajo. Es de esperar que los aloinjertos procesados no puedan igualar la regeneración axonal conseguida por los autoinjertos cuando se superan los 30 mm de defecto nervioso. Sería interesante realizar estudios complementarios sobre el papel del enriquecimiento de los injertos nerviosos con factores de crecimiento o células para estimular aún más la regeneración axonal (89).

6/ CONCLUSIONES

6/ CONCLUSIONES

1/ Este trabajo permite demostrar mediante variables histomorfológicas del nervio que la regeneración axonal tras la reparación del nervio ciático con aloinjertos acelulares procesados no se diferencia de la regeneración axonal conseguida mediante el método *gold* estándar actual (autoinjertos) en un defecto de nervio ciático de rata de 14 mm.

2/ Los resultados obtenidos, junto con la ausencia de lesiones de rechazo inmunológico tras el protocolo de descelularización propuesto y la viabilidad técnica de los injertos acelulares, han permitido adaptar el protocolo a la descelularización de nervios de donante humano. Estos injertos acelulares humanos podrían emplearse en la práctica clínica diaria para tratar lesiones que actualmente se tratan con conductos de colágeno o autoinjertos.

3/ La utilización de dos métodos de preservación de nervios diferentes, fresco y liofilizado, informa de que, si bien ambos permiten una regeneración de los axones similar, los resultados histológicos estudiados en el músculo gastrocnemio medial son superiores en los animales tratados con aloinjertos acelulares preservados en fresco.

4/ La regeneración axonal observada no se correlaciona con los resultados obtenidos en los índices funcionales de los animales ni con los resultados histomorfológicos del músculo.

5/ Los resultados de esta investigación demuestran que la secuencia de acciones semiautomatizada utilizada para calcular las variables histomorfológicas del nervio es altamente eficiente y podría emplearse de forma sistemática para cualquier análisis histológico de nervios. La curva de aprendizaje para investigadores es escasa y la probabilidad de error muy baja, al incluir pasos intermedios en los que poder corregir los errores derivados de la automatización. La rigurosidad y el detalle reflejado en la realización del estudio histomorfológico del nervio es una de las fortalezas del estudio.

7/ BIBLIOGRAFÍA

7/ BIBLIOGRAFÍA

1. Dumanian GA, Potter BK, Mioton LM, Ko JH, Cheesborough JE, Souza JM, et al. Targeted Muscle Reinnervation Treats Neuroma and Phantom Pain in Major Limb Amputees: A Randomized Clinical Trial. *Ann Surg.* agosto de 2019;270(2):238-46.
2. Isaacs J. Major peripheral nerve injuries. *Hand Clin.* agosto de 2013;29(3):371-82.
3. Szykaruk M, Kemp SWP, Wood MD, Gordon T, Borschel GH. Experimental and clinical evidence for use of decellularized nerve allografts in peripheral nerve gap reconstruction. *Tissue Eng Part B Rev.* febrero de 2013;19(1):83-96.
4. Noble J, Munro CA, Prasad VS, Midha R. Analysis of upper and lower extremity peripheral nerve injury in a population of patients with multiple injuries. *J Trauma.* julio de 1998;45(1):116-22.
5. Robinson LR. Traumatic injury to peripheral nerves. *Muscle Nerve.* junio de 2000;23(6):863-73.
6. Ives GC, Kung TA, Nghiem BT, Ursu DC, Brown DL, Cederna PS, et al. Current State of the Surgical Treatment of Terminal Neuromas. *Neurosurgery.* 19 de octubre de 2017;
7. Ehde DM, Czerniecki JM, Smith DG, Campbell KM, Edwards WT, Jensen MP, et al. Chronic phantom sensations, phantom pain, residual limb pain, and other regional pain after lower limb amputation. *Arch Phys Med Rehabil.* agosto de 2000;81(8):1039-44.
8. Hsu E, Cohen SP. Postamputation pain: epidemiology, mechanisms, and treatment. *J Pain Res.* 2013;6:121-36.
9. Tintle SM, Baechler MF, Nanos GP, Forsberg JA, Potter BK. Reoperations following combat-related upper-extremity amputations. *J Bone Joint Surg Am.* 15 de agosto de 2012;94(16):e1191-1196.
10. Ciaramitaro P, Mondelli M, Logullo F, Grimaldi S, Battiston B, Sard A, et al. Traumatic peripheral nerve injuries: epidemiological findings, neuropathic pain and quality of life in 158 patients. *J Peripher Nerv Syst.* junio de 2010;15(2):120-7.
11. Taylor CA, Braza D, Rice JB, Dillingham T. The incidence of peripheral nerve injury in extremity trauma. *Am J Phys Med Rehabil.* mayo de 2008;87(5):381-5.
12. Pan D, Mackinnon SE, Wood MD. Advances in the repair of segmental nerve injuries and trends in reconstruction. *Muscle Nerve.* 2020;61(6):726-39.
13. Safa B, Buncke G. Autograft Substitutes: Conduits and Processed Nerve Allografts. *Hand Clin.* mayo de 2016;32(2):127-40.
14. Millesi H. Bridging defects: autologous nerve grafts. *Acta Neurochir Suppl.* 2007;100:37-8.

15. Dellon AL, Mackinnon SE. An alternative to the classical nerve graft for the management of the short nerve gap. *Plast Reconstr Surg.* noviembre de 1988;82(5):849-56.
16. Dahlin LB, Lundborg G. Use of tubes in peripheral nerve repair. *Neurosurg Clin N Am.* abril de 2001;12(2):341-52.
17. Boeckstyns MEH, Sørensen AI, Viñeta JF, Rosén B, Navarro X, Archibald SJ, et al. Collagen conduit versus microsurgical neuroorrhaphy: 2-year follow-up of a prospective, blinded clinical and electrophysiological multicenter randomized, controlled trial. *J Hand Surg Am.* diciembre de 2013;38(12):2405-11.
18. Azouz SM, Lucas HD, Mahabir RC, Noland SS. A Survey of the Prevalence and Practice Patterns of Human Acellular Nerve Allograft Use. *Plast Reconstr Surg Glob Open.* agosto de 2018;6(8):e1803.
19. Wood MD, Kemp SWP, Weber C, Borschel GH, Gordon T. Outcome measures of peripheral nerve regeneration. *Ann Anat.* julio de 2011;193(4):321-33.
20. Moore AM, MacEwan M, Santosa KB, Chenard KE, Ray WZ, Hunter DA, et al. Acellular nerve allografts in peripheral nerve regeneration: a comparative study. *Muscle Nerve.* agosto de 2011;44(2):221-34.
21. Johnson PC, Duhamel RC, Meezan E, Brendel K. Preparation of cell-free extracellular matrix from human peripheral nerve. *Muscle Nerve.* 1 de abril de 1982;5(4):335-44.
22. Sondell M, Lundborg G, Kanje M. Regeneration of the rat sciatic nerve into allografts made acellular through chemical extraction. *Brain Res.* 8 de junio de 1998;795(1-2):44-54.
23. Hudson TW, Liu SY, Schmidt CE. Engineering an improved acellular nerve graft via optimized chemical processing. *Tissue Eng.* octubre de 2004;10(9-10):1346-58.
24. Hudson TW, Zawko S, Deister C, Lundy S, Hu CY, Lee K, et al. Optimized acellular nerve graft is immunologically tolerated and supports regeneration. *Tissue Eng.* diciembre de 2004;10(11-12):1641-51.
25. Kubiak CA, Kung TA, Brown DL, Cederna PS, Kemp SWP. State-of-the-Art Techniques in Treating Peripheral Nerve Injury. *Plastic and Reconstructive Surgery.* marzo de 2018;141(3):702.
26. Gordon T, Chan KM, Sulaiman OAR, Udina E, Amirjani N, Brushart TM. Accelerating axon growth to overcome limitations in functional recovery after peripheral nerve injury. *Neurosurgery.* octubre de 2009;65(4 Suppl):A132-144.
27. Wood MD, Mackinnon SE. Pathways regulating modality-specific axonal regeneration in peripheral nerve. *Exp Neurol.* marzo de 2015;265:171-5.
28. Whitlock EL, Tuffaha SH, Luciano JP, Yan Y, Hunter DA, Magill CK, et al. Processed allografts and type I collagen conduits for repair of peripheral nerve gaps. *Muscle Nerve.* junio de 2009;39(6):787-99.

29. 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.
30. DECRETO 194/2019 de 31 de octubre, de segunda modificación del Decreto 87/2009, de 29 de julio, por el que se establecen los precios públicos a aplicar por el Servicio de Salud del Principado de Asturias por la prestación de servicios sanitarios. (Boletín oficial del Principado de Asturias, número 219, de 13 de noviembre de 2019).
31. Rinker BD, Ingari JV, Greenberg JA, Thayer WP, Safa B, Buncke GM. Outcomes of short-gap sensory nerve injuries reconstructed with processed nerve allografts from a multicenter registry study. *J Reconstr Microsurg.* junio de 2015;31(5):384-90.
32. Taras JS, Amin N, Patel N, McCabe LA. Allograft reconstruction for digital nerve loss. *J Hand Surg Am.* octubre de 2013;38(10):1965-71.
33. Sachanandani NF, Pothula A, Tung TH. Nerve Gaps. *Plastic and Reconstructive Surgery.* febrero de 2014;133(2):313.
34. Saheb-Al-Zamani M, Yan Y, Farber SJ, Hunter DA, Newton P, Wood MD, et al. Limited regeneration in long acellular nerve allografts is associated with increased Schwann cell senescence. *Exp Neurol.* septiembre de 2013;247:165-77.
35. Hong T, Wood I, Hunter DA, Yan Y, Mackinnon SE, Wood MD, et al. Neuroma Management: Capping Nerve Injuries With an Acellular Nerve Allograft Can Limit Axon Regeneration. *Hand (N Y).* 29 de mayo de 2019;1558944719849115.
36. wamsleyk. Strategies of Peripheral Nerve Surgery [Internet]. *Surgical Education.* 2016 [citado 26 de octubre de 2018]. Disponible en: <https://surgicaleducation.wustl.edu/strategies-of-peripheral-nerve-surgery/>
37. 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.
38. 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.
39. Strasberg JE, Strasberg S, Mackinnon SE, Watanabe O, Hunter DA, Tarasidis G. Strain differences in peripheral-nerve regeneration in rats. *J Reconstr Microsurg.* mayo de 1999;15(4):287-93.
40. Kovacic U, Sketelj J, Bajrović FF. Sex-related difference in collateral sprouting of nociceptive axons after peripheral nerve injury in the rat. *Exp Neurol.* noviembre de 2003;184(1):479-88.
41. Roglio I, Bianchi R, Gotti S, Scurati S, Giatti S, Pesaresi M, et al. Neuroprotective effects of dihydroprogesterone and progesterone in an experimental model of nerve crush injury. *Neuroscience.* 26 de agosto de 2008;155(3):673-85.

42. Animal Research Review Panel. ARRP Guideline 20: Guidelines for the Housing of Rats in Scientific Institutions [Internet]. Disponible en: https://www.animaethics.org.au/__data/assets/pdf_file/0014/222512/housing-rats-scientific-institutions.pdf
43. Wood MD, Kemp SWP, Liu EH, Szykaruk M, Gordon T, Borschel GH. Rat-derived processed nerve allografts support more axon regeneration in rat than human-derived processed nerve xenografts. *J Biomed Mater Res A*. abril de 2014;102(4):1085-91.
44. Nichols CM, Myckatyn TM, Rickman SR, Fox IK, Hadlock T, Mackinnon SE. Choosing the correct functional assay: a comprehensive assessment of functional tests in the rat. *Behav Brain Res*. 8 de septiembre de 2005;163(2):143-58.
45. Badia J, Pascual-Font A, Vivó M, Udina E, Navarro X. Topographical distribution of motor fascicles in the sciatic-tibial nerve of the rat. *Muscle Nerve*. agosto de 2010;42(2):192-201.
46. Prodanov D, Feirabend HKP. Morphometric analysis of the fiber populations of the rat sciatic nerve, its spinal roots, and its major branches. *J Comp Neurol*. 1 de julio de 2007;503(1):85-100.
47. 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.
48. 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.
49. Kanaya F, Firrell JC, Breidenbach WC. Sciatic function index, nerve conduction tests, muscle contraction, and axon morphometry as indicators of regeneration. *Plast Reconstr Surg*. diciembre de 1996;98(7):1264-71.
50. Hamm RJ, Pike BR, O'Dell DM, Lyeth BG, Jenkins LW. The rotarod test: an evaluation of its effectiveness in assessing motor deficits following traumatic brain injury. *J Neurotrauma*. abril de 1994;11(2):187-96.
51. Schindelin J, Arganda-Carreras I, Frise E, Kaynig V, Longair M, Pietzsch T, et al. Fiji: an open-source platform for biological-image analysis. *Nature Methods*. julio de 2012;9(7):676-82.
52. Schneider CA, Rasband WS, Eliceiri KW. NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. *Nat Methods*. julio de 2012;9(7):671-5.
53. Martínez Nistal Á. *Proceso y Análisis de Imágenes con ImageJ-Fiji*. Oviedo, España.: Universidad de Oviedo; 2016.
54. Geuna S, Gigo-Benato D, Rodrigues A de C. On sampling and sampling errors in histomorphometry of peripheral nerve fibers. *Microsurgery*. 2004;24(1):72-6.
55. Martins RS, Siqueira MG, da Silva CF, Plese JPP. Correlation between parameters of electrophysiological, histomorphometric and sciatic functional index evaluations

- after rat sciatic nerve repair. *Arq Neuropsiquiatr.* septiembre de 2006;64(3B):750-6.
56. Weber RA, Proctor WH, Warner MR, Verheyden CN. Autotomy and the sciatic functional index. *Microsurgery.* 1993;14(5):323-7.
 57. Carr MM, Best TJ, Mackinnon SE, Evans PJ. Strain differences in autotomy in rats undergoing sciatic nerve transection or repair. *Ann Plast Surg.* junio de 1992;28(6):538-44.
 58. Dellon AL, Mackinnon SE. Sciatic nerve regeneration in the rat. Validity of walking track assessment in the presence of chronic contractures. *Microsurgery.* 1989;10(3):220-5.
 59. Hare GM, Evans PJ, Mackinnon SE, Best TJ, Bain JR, Szalai JP, et al. Walking track analysis: a long-term assessment of peripheral nerve recovery. *Plast Reconstr Surg.* febrero de 1992;89(2):251-8.
 60. Munro CA, Szalai JP, Mackinnon SE, Midha R. Lack of association between outcome measures of nerve regeneration. *Muscle Nerve.* agosto de 1998;21(8):1095-7.
 61. Shenaq JM, Shenaq SM, Spira M. Reliability of sciatic function index in assessing nerve regeneration across a 1 cm gap. *Microsurgery.* 1989;10(3):214-9.
 62. Wang T, Ito A, Aoyama T, Nakahara R, Nakahata A, Ji X, et al. Functional evaluation outcomes correlate with histomorphometric changes in the rat sciatic nerve crush injury model: A comparison between sciatic functional index and kinematic analysis. *PLoS One* [Internet]. 12 de diciembre de 2018 [citado 30 de mayo de 2021];13(12). Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6291147/>
 63. Valero-Cabré A, Navarro X. Functional impact of axonal misdirection after peripheral nerve injuries followed by graft or tube repair. *J Neurotrauma.* noviembre de 2002;19(11):1475-85.
 64. Ijkema-Paassen J, Meek MF, Gramsbergen A. Reinnervation of muscles after transection of the sciatic nerve in adult rats. *Muscle Nerve.* junio de 2002;25(6):891-7.
 65. Navarro X. Functional evaluation of peripheral nerve regeneration and target reinnervation in animal models: a critical overview. *Eur J Neurosci.* febrero de 2016;43(3):271-86.
 66. Devesa P, Gelabert M, González-Mosquera T, Gallego R, Relova JL, Devesa J, et al. Growth hormone treatment enhances the functional recovery of sciatic nerves after transection and repair. *Muscle Nerve.* marzo de 2012;45(3):385-92.
 67. Thompson W, Jansen JK. The extent of sprouting of remaining motor units in partly denervated immature and adult rat soleus muscle. *Neuroscience.* 1977;2(4):523-35.

68. Tam SL, Archibald V, Jassar B, Tyreman N, Gordon T. Increased neuromuscular activity reduces sprouting in partially denervated muscles. *J Neurosci*. 15 de enero de 2001;21(2):654-67.
69. Geuna S, Tos P, Guglielmone R, Battiston B, Giacobini-Robecchi MG. Methodological issues in size estimation of myelinated nerve fibers in peripheral nerves. *Anat Embryol*. julio de 2001;204(1):1-10.
70. 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.
71. Hunter DA, Moradzadeh A, Whitlock EL, Brenner MJ, Myckatyn TM, Wei CH, et al. Binary imaging analysis for comprehensive quantitative histomorphometry of peripheral nerve. *J Neurosci Methods*. 15 de octubre de 2007;166(1):116-24.
72. Torch S, Usson Y, Saxod R. Automated morphometric study of human peripheral nerves by image analysis. *Pathol Res Pract*. noviembre de 1989;185(5):567-71.
73. Ronchi G, Jager SB, Vaegter CB, Raimondo S, Giacobini-Robecchi MG, Geuna S. Discrepancies in quantitative assessment of normal and regenerated peripheral nerve fibers between light and electron microscopy. *J Peripher Nerv Syst*. septiembre de 2014;19(3):224-33.
74. Brenner MJ, Moradzadeh A, Myckatyn TM, Tung THH, Mendez AB, Hunter DA, et al. Role of timing in assessment of nerve regeneration. *Microsurgery*. 2008;28(4):265-72.
75. Brushart TM, Hoffman PN, Royall RM, Murinson BB, Witzel C, Gordon T. Electrical stimulation promotes motoneuron regeneration without increasing its speed or conditioning the neuron. *J Neurosci*. 1 de agosto de 2002;22(15):6631-8.
76. Lundborg G, Dahlin LB, Danielsen N, Gelberman RH, Longo FM, Powell HC, et al. Nerve regeneration in silicone chambers: influence of gap length and of distal stump components. *Exp Neurol*. mayo de 1982;76(2):361-75.
77. Williams LR, Longo FM, Powell HC, Lundborg G, Varon S. Spatial-temporal progress of peripheral nerve regeneration within a silicone chamber: parameters for a bioassay. *J Comp Neurol*. 20 de agosto de 1983;218(4):460-70.
78. Tang P, Kilic A, Konopka G, Regalbuto R, Akelina Y, Gardner T. Histologic and functional outcomes of nerve defects treated with acellular allograft versus cabled autograft in a rat model. *Microsurgery*. septiembre de 2013;33(6):460-7.
79. Fox IK, Brenner MJ, Johnson PJ, Hunter DA, Mackinnon SE. Axonal regeneration and motor neuron survival after microsurgical nerve reconstruction. *Microsurgery*. octubre de 2012;32(7):552-62.
80. Vleggeert-Lankamp CLAM. The role of evaluation methods in the assessment of peripheral nerve regeneration through synthetic conduits: a systematic review. Laboratory investigation. *J Neurosurg*. diciembre de 2007;107(6):1168-89.

81. Redett R, Jari R, Crawford T, Chen Y-G, Rohde C, Brushart TM. Peripheral pathways regulate motoneuron collateral dynamics. *J Neurosci*. 12 de octubre de 2005;25(41):9406-12.
82. Chamberlain LJ, Yannas IV, Hsu HP, Strichartz G, Spector M. Collagen-GAG substrate enhances the quality of nerve regeneration through collagen tubes up to level of autograft. *Exp Neurol*. diciembre de 1998;154(2):315-29.
83. Hodde JP, Record RD, Liang HA, Badylak SF. Vascular endothelial growth factor in porcine-derived extracellular matrix. *Endothelium*. 2001;8(1):11-24.
84. Hodde JP, Ernst DMJ, Hiles MC. An investigation of the long-term bioactivity of endogenous growth factor in OASIS Wound Matrix. *J Wound Care*. enero de 2005;14(1):23-5.
85. Mackinnon SE, Dellon AL, O'Brien JP. Changes in nerve fiber numbers distal to a nerve repair in the rat sciatic nerve model. *Muscle Nerve*. noviembre de 1991;14(11):1116-22.
86. Kobayashi J, Mackinnon SE, Watanabe O, Ball DJ, Gu XM, Hunter DA, et al. The effect of duration of muscle denervation on functional recovery in the rat model. *Muscle Nerve*. julio de 1997;20(7):858-66.
87. 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.
88. Aird RB, Naffziger HC. The pathology of human striated muscle following denervation. *J Neurosurg*. mayo de 1953;10(3):216-27.
89. Neubauer D, Graham JB, Muir D. Chondroitinase treatment increases the effective length of acellular nerve grafts. *Exp Neurol*. septiembre de 2007;207(1):163-70.

8/ ANEXO

8/ ANEXO

/ AUTORIZACIÓN PARA UTILIZACIÓN DE ANIMALES

GOBIERNO DEL PRINCIPADO DE ASTURIAS

CONSEJERÍA DE DESARROLLO RURAL Y RECURSOS NATURALES

ADMÓN. PRINCIPADO DE ASTURIAS

Reg. Salida N.º 2017020714020547

22/05/2017 13:06:02

RESOLUCIÓN de 15 de mayo de 2017, de la Consejería de Desarrollo Rural y Recursos Naturales, sobre autorización de proyectos de investigación que utilicen animales de experimentación. PROAE 11/2017

JUAN ARGÜELLES LUIS
DPTO. BIOLOGÍA FUNCIONAL
FACULTAD DE MEDICINA
AVDA. JULIÁN CLAVERÍA, S/N
33006 OVIEDO
ASTURIAS

Con fecha 15 de mayo 2017 la Ilma. Sra. Consejera de Desarrollo Rural y Recursos Naturales, ha dictado la siguiente Resolución:

"ANTECEDENTES DE HECHO

Primero.- Con fecha 6 de abril de 2017, **JOSE RAMÓN OBESO SUÁREZ** en representación del **BIOTERIO DE LA UNIVERSIDAD DE OVIEDO**, presentó solicitud de autorización para la utilización de animales en el siguiente proyecto de experimentación **"RECONSTRUCCIÓN DE NEVIO PERIFÉRICO MEDIANTE EL USO DE ALOINJERTOS Y XENOINJERTOS. ESTUDIO EXPERIMENTAL"**, constando como investigador principal D. **JUAN ARGÜELLES LUIS** y como investigador responsable de los procedimientos con animales D. **JUAN ARGÜELLES LUIS**.

Junto con la solicitud, aporta la propuesta del proyecto, el resumen no técnico e informe del comité ético y de evaluación del proyecto por el órgano habilitado.

Segundo.- El lugar donde se desarrollará el proyecto se encuentra autorizado como establecimiento usuario y está inscrito en el Registro de Explotaciones Ganaderas con el número **ES330440003591**.

Tercero.- Con fecha **6 de abril de 2017**, el Comité de Ética del centro emite un informe favorable, conforme al RD 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.

Cuarto.- Con fecha **6 de abril de 2017**, el Comité Ético de Experimentación animal de **LA UNIVERSIDAD DE OVIEDO**, órgano habilitado, emite informe de evaluación favorable del proyecto, indicando que el proyecto cuyos datos y evaluación se proporcionan han sido evaluados con un nivel de detalle apropiados y que la evaluación ha consistido en verificar que el proyecto cumple los requisitos especificados en el artículo 34 del RD 53/2013 de 1 de febrero y que, tanto el investigador responsable del proyecto como las personas encargadas de la realización del mismo tienen capacitación para ello.

Quinto.- Una vez revisada la solicitud y la documentación presentada, la Jefa del Servicio de Sanidad y Producción Animal elevó con fecha **11 de mayo de 2017** una propuesta de resolución de autorización de proyectos de investigación que utilicen animales de experimentación.

FUNDAMENTOS DE DERECHO

Primero.- El artículo 25 del 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, dispone:

"2. Los procedimientos solo se podrán realizar si están incluidos dentro del marco de un proyecto autorizado de acuerdo con la sección 2ª de este capítulo.

3. Los procedimientos deberán realizarse de forma que se evite a los animales cualquier dolor, sufrimiento, angustia o daño duradero que sean innecesarios.

4. Los procedimientos se realizarán en centros usuarios autorizados, salvo autorización del órgano competente, previa justificación científica de la necesidad o conveniencia de que se realicen fuera de dichos centros.

5. Los procedimientos únicamente podrán ser realizados por personas capacitadas o autorizadas de forma temporal en las condiciones establecidas en el artículo 15.3 bajo supervisión responsable”.

Asimismo, el artículo 31 del citado Real Decreto, situado en su sección 2ª, regula la tipología de proyectos con arreglo a la siguiente clasificación:

“1. Proyectos de tipo I: Aquellos proyectos en los que se den simultáneamente las tres circunstancias siguientes:

- a) Implican exclusivamente procedimientos clasificados como «sin recuperación», «leves» o «moderados».
- b) No utilizan primates.
- c) Se realizan para cumplir requisitos legales o reglamentarios, o con fines de producción o diagnóstico por métodos establecidos.

Los proyectos tipo I podrán ser tramitados por un procedimiento simplificado y no ser sometidos a evaluación retrospectiva.

2. Proyectos de tipo II: Aquellos proyectos en los que se den simultáneamente las circunstancias siguientes:

- a) Implican exclusivamente procedimientos clasificados como «sin recuperación», «leves» o «moderados».
- b) No utilizan primates.

Los proyectos tipo II quedarán sujetos al procedimiento de autorización y podrán no ser sometidos a evaluación retrospectiva.

3. Proyectos de tipo III: Los proyectos diferentes de los tipos I o II. Sin perjuicio de las autorizaciones adicionales a las que puedan estar condicionados determinados proyectos, todos los proyectos tipo III quedarán sujetos al procedimiento de autorización y serán sometidos posteriormente a una evaluación retrospectiva”.

Segundo.- El proyecto para el que se solicita la autorización ha de ser considerado dentro del **tipo II**, puesto que implica procedimientos clasificados como **“moderados”**: **IDENTIFICACIÓN MEDIANTE CORTE DE OREJAS, GENERACIÓN DE DEFECTOS NERVIOSOS, ALOINJERTOS Y XENOINJERTOS y VALORACIÓN FUNCIONAL DEL IMPULSO NERVIOSO**, y no utiliza primates.

El establecimiento donde se desarrollará tiene la correspondiente autorización.

Los informes emitidos al respecto son favorables, por lo que, cumpliendo con los requisitos previstos, ha de procederse a su autorización.

Deberá someterse a **evaluación retrospectiva** tras la finalización del proyecto prevista en **diciembre de 2018**.

GOBIERNO DEL PRINCIPADO DE ASTURIAS

CONSEJERÍA DE DESARROLLO RURAL Y RECURSOS NATURALES

RESUELVO

Primero.- Autorizar al **BIOTERIO DE LA UNIVERSIDAD DE OVIEDO**, el proyecto denominado: **"RECONSTRUCCIÓN DE NEVIO PERIFÉRICO MEDIANTE EL USO DE ALOINJERTOS Y XENOINJERTOS. ESTUDIO EXPERIMENTAL"** en el que consta como investigador principal D. **JUAN ARGÜELLES LUIS** y como investigador responsable de los procedimientos con animales D. **JUAN ARGÜELLES LUIS**.

Esta autorización tendrá una validez que se corresponderá con la duración prevista en su memoria, con un máximo de cinco años, siempre y cuando no se produzca una modificación relevante en dicho proyecto, en cuyo caso sería necesario efectuar una nueva solicitud de autorización a la autoridad competente.

Segundo.- Asignar el código de autorización: **PROAE 11/2017**

Tercero.- Ordenar la notificación de la presente Resolución al interesado.

Cuarto.- La presente resolución pone fin a la vía administrativa y contra ella cabe interponer recurso contencioso-administrativo ante la Sala de lo Contencioso-Administrativo del Tribunal Superior de Justicia del Principado de Asturias en el plazo de dos meses, contados desde el día siguiente al de su notificación, de acuerdo con lo establecido en los artículos 10 y 46 de la Ley 29/1998, de 13 de julio, reguladora de la Jurisdicción Contencioso-Administrativa, sin perjuicio de la posibilidad de previa interposición del recurso potestativo de reposición ante el mismo órgano que dictó el acto, en el plazo de un mes contado desde el día siguiente al de su notificación, no pudiendo simultanearse ambos recursos, conforme a lo establecido en el artículo 28 de la Ley del Principado de Asturias 2/1995, de 13 de marzo, sobre Régimen Jurídico de la Administración y en el artículo 123 de la Ley 39/2015, de 1 de octubre, del Procedimiento Administrativo Común de las Administraciones Públicas. No obstante, los interesados podrán ejercitar, en su caso, cualquier otro recurso que estimen procedente."

Lo que le comunico para su conocimiento y efectos.

Oviedo, a 16 de mayo de 2017
LA JEFA DEL SERVICIO DE SANIDAD
Y PRODUCCIÓN ANIMAL



