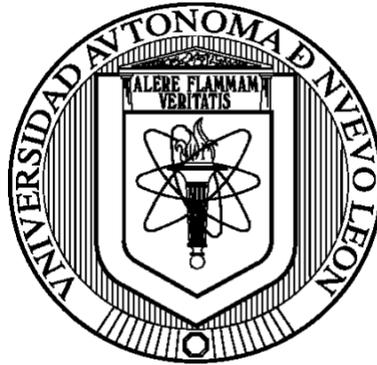


**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN**  
**FACULTAD DE MEDICINA**



**USO DE INJERTO DE NERVIOS ACELULARES  
RECELULARIZADOS CON CÉLULAS TIPO SCHWANN: ENSAYO  
PRE-CLÍNICO**

**Por**

**DRA. YADIRA ALEJANDRA TAMEZ MATA**

**COMO REQUISITO PARA OBTENER EL GRADO DE  
DOCTOR EN MEDICINA**

**Julio, 2021**

**USO DE INJERTO DE NERVIOS ACELULARES  
RECELULARIZADOS CON CÉLULAS TIPO SCHWANN: ENSAYO  
PRE-CLÍNICO**

**Aprobación de la tesis:**



---

**Dr. med. José Félix Vilchez Cavazos**  
Director de la tesis



---

**Dr. C. Herminia Guadalupe Martínez Rodríguez**  
Co-Director



---

**Dr. med. Mauricio Manuel García Pérez**  
Miembro



---

**Dr. C. Roberto Montes de Oca Luna**  
Miembro



---

**Dr. med. Víctor Manuel Peña Martínez**  
Miembro

---

**Dr. med. Felipe Arturo Morales Martínez**  
Subdirector de Estudios de Posgrado

## AGRADECIMIENTOS

*«Yo te instruiré, yo te mostraré el camino que debes seguir;  
yo te daré consejos y velaré por ti» Salmo 32:8*

Primeramente, a Dios gracias, sin Él no se tiene nada.

A mi amado esposo, por apoyarme en cada paso que doy. Sin duda, me has impulsado a lograr cada meta y hemos crecido personal y profesionalmente, sigamos avanzando juntos. Te amo mi ingeniero Héctor René Elizondo Elizondo.

A mis padres, por educarme y creer en mí. Por brindarme su amor y cariño, por educarme con valores y creencias, por enseñarme que todo lo que te propongas lo puedes lograr, que el único límite eres tu mismo. A mis hermanos, Víctor e Iván, por ser tan parecidos y diferentes a la vez, los amo.

A mis asesores, que formaron un gran equipo multidisciplinario de trabajo:

Al Dr. med. Félix Vilchez, gracias por cada enseñanza dada y por la confianza que me ha brindado a lo largo de estos años, es un gusto formar parte de su equipo de trabajo, continuemos investigando.

A la Dr. C. Herminia Martínez, gracias por acogerme y hacerme sentir parte de su laboratorio, gracias por su tiempo, por sus enseñanzas y por escucharme en todo momento.

Al Dr. med. Mauricio García, gracias por invertir su tiempo en este proyecto, gracias por el impulso y por confiar en mí. Es admirable el trabajo que realiza, en la clínica y en la investigación, gracias por todo su apoyo.

Al Dr. C. Roberto Montes de Oca, gracias por cada consejo que enriqueció este proyecto, que en conjunto con el Dr. C. Adolfo Soto permitieron el análisis histológico completo. Gracias por todo su apoyo.

Al Dr. med. Víctor Peña, gracias por la confianza y por permitirme crecer académica y personalmente durante este periodo. Gracias por todo su apoyo.

Al personal del Laboratorio de Terapia Celular del Departamento de Bioquímica y Medicina Molecular de la Facultad de Medicina de la UANL, que nos guió con la preparación del injerto y su recelularización. Gracias MsC. Florencia Estefana Pedroza Montoya, valoro mucho tu amistad, eres la mejor *lab-partner* que pude tener y a la Dr. C. Elsa Nancy Garza Treviño, por su docencia y por su amistad.

Al personal del Laboratorio de Histotecnología del Departamento de Histología de la Facultad de Medicina de la UANL, que nos asesoró con el análisis del injerto acelular y en la evaluación final de las muestras. Gracias Dr.C. Adolfo Soto, por su compromiso y su dedicación para con nosotros. Gracias al MVZ Luis Botello por su colaboración en el procesamiento de las muestras. Gracias Tec. Iván Aristeo, estudiante de medicina Edgar Piña, MsC. Gloria Guillén por cada consejo brindado y por colaborar en este proyecto.

Al personal del Servicio de Cirugía Plástica, Estética y Reconstructiva que nos acompañó en cada cirugía realizada: Dr. med. Mauricio García y Dr. Andreí Ríos y al Dr. Raúl González, quien realizó cada prueba de neuroconducción.

Al personal de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la UANL. Al MVZ Adalberto Abrego y al MVZ Jorge Lozano, gracias por su paciencia, disposición y amabilidad en este proyecto y por la estabulación de las borreguitas. Y al MVZ Uziel Castillo, gracias por permitirnos hacer uso de las instalaciones del laboratorio de Inmunología Veterinaria.

Al personal del Banco de Hueso y Tejidos, mi segunda familia. Dr. med. Félix Vilchez, Dr. med. Carlos Acosta, Dr. med. Víctor Peña, Dr. C. Mario Simental, Dr. C. Jorge Lara, Lic. Alejandro Rentería, Lic. Gricelda Ondarza, Lic. David Pacheco, Tec. Noe de la Cruz, Tec. Carlos Torres, Elvia Barajas, Nohemí Rodríguez muchísimas gracias y aquellos que pasaron temporalmente, pero dejaron su huella y apoyaron *mientras* fueron médicos pasantes, Erick, Meza, Rodrigo, Rubén, William, Sofía, Aimé, Andrea, Karla y Jacqueline. A todos ustedes, gracias, por formar parte de las memorias de este proyecto.

Al personal administrativo de cada uno de los departamentos, Juani y Cristy, Juany, Evelyn, Marlene y Gaby, que nos facilitaban cada trámite necesario.

A la Dr. C. Jannet Edith Salinas Hernández, quien despertó mi interés en la investigación cuando cursé la preparatoria y es fecha que conservo de su guía científica, pero sobre todo de su amistad.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por el apoyo otorgado mediante una beca para poder realizar este proyecto.

# TABLA DE CONTENIDO

Índice de Tablas .....	x
Índice de Figuras .....	xi
Lista de Abreviaturas .....	xiii

Capítulo I		Página
1.	RESUMEN .....	1
Capítulo II		
2.	INTRODUCCIÓN .....	3
2.1	Antecedentes Generales .....	3
2.1.1	Lesión de nervio periférico .....	3
2.1.2	Reconstrucción de nervio periférico .....	5
2.1.3	Aloinjerto descelularizado .....	6
2.1.4	Aloinjerto recelularizado .....	7
2.1.5	Aloinjertos en la clínica .....	9
2.2	Antecedentes Directos .....	10
2.3	Originalidad .....	12
2.4	Justificación .....	12
2.5	Meta del Estudio .....	13
Capítulo III		
3.	HIPÓTESIS .....	14

## Capítulo IV

4.	OBJETIVOS .....	13
4.1	Objetivo General .....	15
4.2	Objetivos Específicos .....	15

## Capítulo V

5.	MATERIAL Y MÉTODOS .....	16
5.1	Diseño del estudio y estrategia general .....	16
5.2	Modelo animal .....	18
5.2.1	Consideraciones éticas y criterios .....	19
5.2.2	Cálculo del tamaño de la muestra .....	21
5.3	Preparación del aloinjerto .....	22
5.3.1	Aislamiento y caracterización CMM-TA .....	22
5.3.2	Preparación del ANA .....	23
5.3.3	Pre-diferenciación de CMM-TA a CtS .....	25
5.4	Cirugía del nervio peroneo .....	26
5.5	Evaluación de la funcionalidad .....	30
5.6	Evaluación de la conducción nerviosa .....	31
5.7	Evaluación histológica .....	33
5.8	Análisis Estadístico .....	37

## Capítulo VI

6.	RESULTADOS .....	38
6.1	Aloinjerto Recelularizado .....	38

6.1.1	Caracterización y pre-diferenciación de CMM-TA a CtS .....	38
6.1.2	Aloinjerto nervioso acelular.....	39
6.2	Funcionalidad de la Extremidad .....	41
6.3	Conducción nerviosa .....	42
6.4	Análisis Histológico .....	48
6.4.1	Morfología del nervio .....	48
6.4.2	Morfometría del nervio .....	51

## Capítulo VII

7.	DISCUSIÓN .....	55
7.1	Aloinjerto Recelularizado .....	55
7.1.1	Caracterización y pre-diferenciación de CMM-TA a CtS .....	56
7.1.2	Aloinjerto nervioso acelular .....	57
7.2	Funcionalidad de la extremidad .....	58
7.3	Conducción nerviosa .....	58
7.4	Histología del nervio .....	59
7.5	Limitantes del estudio .....	61

## Capítulo VIII

8.	CONCLUSIÓN .....	62
----	------------------	----

## Capítulo IX

9. ANEXOS .....	63
9.1 Medios y soluciones para cultivo celular .....	63
9.1.1. Solución salina amortiguada por fosfatos (PBS) .....	63
9.1.2. PBS 1X suplementado .....	64
9.1.3. PBS 1X suplementado para cultivo celular ..	65
9.1.4. Colagenasa I al 0.2% .....	65
9.1.5. Medio completo .....	66
9.1.6. Azul tripano al 0.2% .....	67
9.2 Técnicas morfológicas para el ANA. ....	66
9.2.1 Técnica histológica convencional .....	67
I. Fijación .....	67
II. Procesamiento .....	68
III. Inclusión, microtomía y montaje .....	69
9.2.2. Desparafinado e hidratación .....	69
9.2.3. Deshidratación, aclaración y montaje .....	70
9.2.4. Tinciones .....	71
a) Hematoxilina y Eosina .....	71
b) Tricrómico de Masson Modificado .....	73
c) Ácido Peryódico de Schiff. ....	74
d) Klüver Barrera .....	76
e) Marsland Glee Erickson .....	78
f) Tetraóxido de osmio y azul de toluidina. ....	79

9.3	Inmunocitoquímica e Inmunohistoquímica .....	83
9.4	Registro de actividad en los ovinos .....	87
Capítulo X		
10.	REFERENCIAS .....	88
Capítulo XI		
11.	RESUMEN AUTOBIOGRÁFICO .....	98

## ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla</b>	<b>Página</b>
1. Pruebas de CNp y CNn en el nervio .....	47

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura</b>	<b>Página</b>
1. Estrategia general .....	17
2. Cronología esquemática del estudio .....	19
3. Procuración de nervio donador .....	22
4. Debridación del nervio .....	24
5. Descelularización de nervio .....	24
6. Pre-diferenciación de CMM-TA a CtS .....	26
7. Cirugía del nervio y trasplante alogénico de CtS .....	28
8. Manejo postoperatorio .....	29
9. Evaluación inicial de la funcionalidad .....	30
10. Evaluación de la conducción nerviosa .....	31
11. Equipo para neuroconducción .....	32
12. Recolección de nervio peroneo .....	33
13. Nervio peroneo fijado.....	34
14. Impregnación argéntica con MGE .....	36
15. Posfijación con tetraóxido de osmio.....	36
16. ICQ con S-100 .....	39
17. Análisis morfológico del nervio descelularizado .....	40
18. Funcionalidad de la extremidad trasera .....	42
19. Conducción nerviosa en piel .....	43
20. Velocidad de conducción en piel .....	44
21. Conducción nerviosa en el nervio .....	45

22. Velocidad de conducción en el nervio .....	46
23. Grado de organización de las fibras nerviosas .....	48
24. Análisis morfológico .....	50
25. Regeneración axonal morfológica .....	51
26. Análisis morfométrico proximal y distal .....	52
27. Análisis morfométrico promedio .....	53
28. Morfometría de la regeneración axonal .....	54
29. Registro de actividad de los ovinos .....	86

## LISTA DE ABREVIATURAS

<b>° C</b>	grados Centígrados
<b>%</b>	Porcentaje
<b>2D</b>	Dos - dimensiones
<b>3D</b>	Tres - dimensiones
<b>ANA</b>	Aloinjerto nervioso acelular
<b>ANOVA</b>	Análisis de varianza
<b>ANP</b>	Aloinjerto nervioso procesado
<b>AR</b>	Aloinjerto recelularizado
<b>AU</b>	Autoinjerto
<b>CA</b>	California
<b>CMH</b>	Complejo mayor de histocompatibilidad
<b>CMH I</b>	Complejo mayor de histocompatibilidad I
<b>CMH II</b>	Complejo mayor de histocompatibilidad II
<b>CMM</b>	Células madre mesenquimales
<b>CMMA-TA</b>	Células madre mesenquimales alogénicas derivadas de tejido adiposo
<b>CMM-TA</b>	Células madre mesenquimales derivadas de tejido adiposo
<b>CNn</b>	Conducción nerviosa en el nervio
<b>CNp</b>	Conducción nerviosa en piel
<b>CO<sub>2</sub></b>	Dióxido de carbono
<b>CS</b>	Células de Schwann

<b>CtS</b>	Células tipo Schwann
<b>CtS/ml</b>	Células tipo Schwann en un mililitro
<b>C/u</b>	Cada uno
<b>DE</b>	Desviación estándar
<b>EDTA</b>	Ácido etilendiaminotetraacético (Ethylenediaminetetraacetic acid)
<b><i>et al.</i></b>	"Et alii " (y otros)
<b>FET</b>	Funcionalidad de la extremidad trasera
<b>g</b>	Gramo
<b>h</b>	Hora
<b>H&amp;E</b>	Hematoxilina y eosina
<b>ICQ</b>	Inmunocitoquímica
<b>IHQ</b>	Inmunohistoquímica
<b>IT</b>	Ingeniería de Tejidos
<b>KB</b>	Klüver Barrera
<b>kg</b>	Kilogramo
<b>l/min</b>	Litros por minuto
<b>LNP</b>	Lesión de nervio periférico
<b>min</b>	Minutos
<b>m/s</b>	Metros por segundos
<b>MD</b>	Maryland
<b>MEC</b>	Matriz extracelular
<b>mg</b>	Miligramos

<b>MGE</b>	Marsland Glee Erickson
<b>μl</b>	Microlitros
<b>ml</b>	Mililitros
<b>mm<sup>2</sup></b>	Milímetros al cuadrado
<b>ms</b>	Milisegundos
<b>mV</b>	Milivoltios
<b>MX</b>	México
<b>nm</b>	Nanómetros
<b>NP</b>	Nervio peroneo
<b>NY</b>	Nueva York
<b>PAS</b>	Ácido Peryódico de Schiff
<b>PBS</b>	Solución amortiguadora de fosfatos (phosphate buffered saline)
<b>pH</b>	Potencial de Hidrógeno
<b>PVC</b>	Cloruro de polivinilo (polyvinylchloride)
<b>Re</b>	Recolección
<b>SB-10</b>	Sulfobetaína - 10
<b>SB-16</b>	Sulfobetaína - 16
<b>s</b>	Segundos
<b>Sham</b>	Simulación, control
<b>TA</b>	Temperatura ambiente
<b>TCM-M</b>	Tricómico de Masson modificado
<b>UANL</b>	Universidad Autónoma de Nuevo León

**V**      Voltios

# CAPÍTULO I

## 1. RESUMEN

**INTRODUCCIÓN.** Los aloinjertos de nervio acelular (ANA) recelularizados con células madre mesenquimales (CMM) o células de Schwann (SC) son actualmente una opción terapéutica para las lesiones de nervio periférico (LNP). Este estudio tuvo como objetivo evaluar la capacidad regenerativa y funcional de un aloinjerto recelularizado (AR) con células tipo Schwann (CtS) en una LNP comparado con un autounjerto (AU). **MÉTODOS.** Se incluyeron al azar catorce ovinos en dos grupos de siete. Se realizó una lesión nerviosa de 30 mm de longitud en el nervio peroneo izquierdo y se realizó la reparación del mismo mediante el trasplante de un AU o un AR con CtS. Las evaluaciones pre-quirúrgicas incluyeron el análisis histomorfológico de los ANA y una adecuada pre-diferenciación de CMMA-TA a CtS. Las evaluaciones post-quirúrgicas evaluaron la recuperación funcional de la extremidad (apoyo y marcha) y la regeneración nerviosa mediante pruebas de neuroconducción y un análisis histológico a un año de seguimiento. Todas las evaluaciones se compararon con la extremidad trasera contralateral. **RESULTADOS.** El aloinjerto de nervio se descelularizó con éxito y más del 70% de las CMMA-TA se diferenciaron a CtS. La evaluación funcional en ambos grupos tratados mejoró con respecto al tiempo de evolución ( $p <$

0.01). Los resultados de neuroconducción (latencia, amplitud y velocidad de conducción) mejoraron de manera similar en ambos grupos tratados a los doce meses. Los resultados histológicos demostraron una disposición menos organizada de las fibras nerviosas ( $p < 0.05$ ) con un proceso de remielinización activo ( $p < 0.0001$ ) en ambos grupos tratados en comparación con los controles a los doce meses. **CONCLUSIONES.** Se logró exitosamente un ANA. El AR demostró ser un tratamiento exitoso, ya que se logró la recuperación funcional de la extremidad y la conducción del impulso nervioso. Este enfoque podría ser útil para su aplicación clínica en las LNP.

## **CAPÍTULO II**

### **2. INTRODUCCIÓN**

#### **2.1 Antecedentes Generales**

##### **2.1.1 Lesión de nervio periférico**

Las lesiones de los nervios periféricos (LNP) resultan en la interrupción parcial o completa de la fisiología normal del nervio. Suelen presentarse en edad productiva y comprometen la funcionalidad del miembro afectado siendo una de las causas más frecuentes de déficit sensitivo-motor y de la pérdida en la productividad en adultos.<sup>1</sup> Se estima una prevalencia del 2% y son secundarias a traumatismos;<sup>2</sup> en la mayoría de los casos, la extremidad superior es la más afectada (61%), seguida por miembros inferiores (15%) y en cara y cuello (14%).<sup>3</sup> La reparación quirúrgica de la LNP es fundamental para promover el proceso de regeneración y la recuperación funcional de la extremidad.<sup>4</sup>

Las LNP se clasifican según a) el tiempo de evolución: agudo o inicial (menor a siete días) y crónico o tardío (mayor a siete días) y según b) el tipo de reparación que requieren. Se ha descrito que un tiempo prolongado entre el traumatismo y la anastomosis del nervio disminuye el grado de recuperación.<sup>5</sup> Una reparación primaria o convencional se realiza cuando el nervio fue seccionado limpiamente o cuando el defecto es pequeño. En ésta se re-aproximan los cabos proximal y distal, realizando un cierre primario (agudo) que esté libre de tensión y permita una libre movilidad. Cuando la intervención se realiza dentro de los 14 días posteriores al traumatismo nervioso, la recuperación funcional es buena en aproximadamente el 80% de los pacientes; una reparación tardía disminuye el grado de recuperación.<sup>5</sup> Sin embargo, a pesar de los importantes avances en la técnica quirúrgica, los resultados y las perspectivas de una recuperación funcional completa son generalmente deficientes, menos del 50% de los pacientes reportan una función motora satisfactoria después de la reconstrucción quirúrgica.<sup>6</sup>

Si en la reparación quirúrgica, los cabos proximales y distales no se encuentran libres de tensión, se requerirá de un injerto de nervio.<sup>7</sup> El autoinjerto (AU) es el tratamiento estándar de oro. Éste se obtiene de un área donadora del mismo paciente. Los nervios donadores más frecuentes son el: safeno cutáneo, cutáneo antebraquial medial y sural. Sin embargo, presenta ciertas limitantes como: a) la necesidad de una segunda cirugía, b) el riesgo de formación de neuroma, c) la morbilidad del sitio donante, d) disponibilidad y longitud limitada;<sup>8</sup> e) reacciones inmunes o inflamatorias y f)

desarrollo de cierto grado de necrosis.<sup>9</sup> Por ello, se requiere de terapias alternativas para su reconstrucción.<sup>10,11</sup>

### **2.1.2 Reconstrucción de nervio periférico**

La medicina regenerativa, cuyo interés es la regeneración de órganos y tejidos, se apoya principalmente en la terapia celular y en la ingeniería de tejidos (IT). La terapia celular se basa en el uso de células madre de distinto origen que, mediante diversos procedimientos, se diferencian en el tipo celular deseado. Mientras que, la IT se enfoca en el desarrollo de sustitutos biológicos que restauren, mantengan o mejoren la función del tejido.<sup>12</sup> Uno de los principales métodos de la IT implica el crecimiento *in vitro* de las células de manera tridimensional (3D), como lo harían naturalmente en el órgano o tejido. No obstante, las células carecen de la capacidad de crecer en una orientación 3D y así definir la forma anatómica del tejido. En su lugar, migran al azar para formar una capa celular de dos dimensiones (2D). Sin embargo, los tejidos 3D son necesarios y esto se logra mediante el cultivo de las células sobre matrices porosas, conocidas como andamios. Es importante señalar que el andamio debe proveer las condiciones y el ambiente necesario para que pueda ocurrir una adecuada regulación celular (adhesión, migración, proliferación y diferenciación), así como permitir el adecuado

suministro de factores bioactivos (de crecimiento y adhesión).<sup>13</sup> En el nervio, la regeneración axonal también requiere de una guía apropiada.

Diversos andamios han sido desarrollados para reconstruir el nervio. Se clasifican en a) artificiales (a base de silicona o poliéster), b) naturales (colágeno, seda o aloinjertos) y c) degradables (quitosano).<sup>11</sup> Nuestra investigación se ha enfocado en los andamios naturales, específicamente en los aloinjertos.

### **2.1.3 Aloinjerto descelularizado**

Los aloinjertos tienen la ventaja de ser un andamio 3D, tener mayor disponibilidad, permiten una variación de tamaño y forma que se adapta a las necesidades del receptor. Pueden obtenerse de un donante cadavérico de la misma especie, lo que ha impulsado el interés en el desarrollo de bancos de tejido nervioso. La principal desventaja es que, el Complejo Mayor de Histocompatibilidad (CMH) aún está presente, por lo que puede ocurrir el rechazo.<sup>14</sup> Ante esta situación, el proceso de descelularización del nervio tiene como objetivo eliminar los componentes celulares, pero al mismo tiempo, mantener la matriz extracelular (MEC) necesaria para promover la regeneración nerviosa y disminuir la inmunogenicidad del injerto.<sup>15</sup> Se han descrito múltiples métodos para la preparación de injertos acelulares de

tejido nervioso de donantes alogénicos, incluyendo la liofilización, la criopreservación, la congelación-descongelación, el procesamiento con detergentes, la irradiación y la exposición a nitrógeno líquido.<sup>16-20</sup> Todas las técnicas convergen en a) reducir la inmunogenicidad del injerto por la eliminación de los componentes celulares y b) mejorar la capacidad de regeneración a través de la conservación de la MEC. Para ello, las técnicas de descelularización a base de detergente son efectivas.<sup>4,21</sup>

#### **2.1.4 Aoinjerto recelularizado**

Se ha reportado que si al injerto descelularizado se le agregan células madre mesenquimales (CMM), la capacidad de regeneración axonal y la funcionalidad del nervio es comparable a la del autoinjerto.<sup>22</sup> Puesto que, mejoran los factores de crecimiento en el sitio de regeneración nerviosa y provocan una mayor regeneración de nervio debido al efecto sinérgico de células adicionales, lo que lleva a mejores resultados funcionales cuando hay un defecto nervioso que reinervar.<sup>23</sup> Las CMM se derivan de la fracción vascular del estroma del tejido adiposo, tienen relevantes ventajas clínicas, que incluyen fácil acceso de su obtención, la rápida proliferación, la fácil diferenciación a estratos celulares como células tipo Schwann (CtS) y efectos inmunomoduladores, posicionándolas como una opción terapéutica.<sup>24</sup>

Las CMM se han considerado hipoinmunogénicas *in vitro* debido a su expresión limitada del CMH I, a la ausencia de expresión de CMH II y de moléculas co-estimuladoras; así como de una incapacidad para estimular la proliferación de células T y de presentar una resistencia contra la citotoxicidad de linfocitos citotóxicos.<sup>25</sup> Por lo que, el riesgo de rechazo es bajo.

Adicionalmente, se ha reportado que las células de Schwann (CS) autólogas agregadas a los injertos nerviosos proporcionan factores neurotróficos que son esenciales para la regeneración nerviosa y se obtienen resultados satisfactorios cuando se aplican en la clínica.<sup>26,27</sup> Gersey *et al.* reportaron la primera experiencia humana con CMM autólogas diferenciadas a CS demostrando la significancia de su uso para la regeneración nerviosa en dos casos clínicos. Se extrajeron células CMM autólogas y se cultivaron y diferenciaron a CS en aproximadamente 30 días para embeber el injerto y reparar el defecto de nervio ciático, dando resultados benéficos a largo plazo (12 y 36 meses) con una mejoría en la sensibilidad, función y resolución del dolor neuropático de los pacientes.<sup>27</sup> Mientras que, en modelos animales, las CS alógenas o xenógenas han sido implantadas exitosamente. Herrmanns *et al.* reportaron que había una ausencia de respuesta inmune, inmediata o tardía, al implantar suspensiones de CS alogénicas y xenogénicas en un tracto del Sistema Nervioso Central previamente lesionado en ratas Wistar.<sup>28</sup> Mosahebi *et al.* señalaron que el trasplante CS alogénico potencia la regeneración axonal y no induce una respuesta inmune deletérea en

comparación con CS singénicas en la regeneración del nervio ciático de ratas.<sup>29</sup> La compatibilidad se debe a que la estructura general del CMH se conserva entre las especies de mamíferos.<sup>30</sup> Un modelo ideal para estudiar este tipo de lesiones son los ovinos, ya que, se han utilizado ampliamente para el estudio de la regeneración de nervios periféricos, especialmente para injertos mayores a 20 mm.<sup>31</sup>

### **2.1.5 Aloinjertos en la clínica**

En la clínica, actualmente, en países como China y Estados Unidos de América, ya se encuentran comercialmente disponibles aloinjertos de nervio humano descelularizado para su aplicación. Recientemente, Saha *et al.* informó del uso de estos aloinjertos nerviosos procesados (ANP) en 385 pacientes; de los cuales, el 82% tuvo una recuperación significativa en las reparaciones de nervios sensoriales, mixtos y motores en lesiones de hasta 70 mm.<sup>32</sup> Además, Saha *et al.* reportaron una recuperación motora significativa en el 73% de los casos de 20 pacientes con 22 reparaciones de ANP de reparación de nervios mixtos y motores que involucraban las extremidades superiores, la cabeza y el cuello, al año de seguimiento.<sup>33</sup> Rinker *et al.* Por su parte, describieron una recuperación significativa del 60% al 88% en cincuenta lesiones del nervio digital en 28 pacientes.<sup>34</sup>

Sin embargo, la disponibilidad de este tipo de tecnología biomédica en nuestro país es nula, y el elevado costo, los trámites legales y la logística que implicaría la importación de los injertos existentes complica en gran medida su uso clínico. Con base en lo anterior, nuestro equipo de investigación se ha enfocado en el estudio de reparación de LNP a partir del uso de terapia celular e injertos de MEC, teniendo como objetivo a largo plazo implementar esta terapia en la clínica.

## **2.2 Antecedentes Directos**

Nuestro equipo de investigación se ha enfocado en el estudio de reparación de LNP a partir del uso de terapia celular e injertos de MEC. El primer acercamiento se centró en lograr la diferenciación de CMM-TA a CtS, mediante su interacción con factores de crecimiento.<sup>35</sup> Posteriormente, se llevó a cabo un estudio, en el cual, un grupo de ratas Wistar fue sometido a una reparación de una lesión del nervio ciático de 15 mm. Esto se llevó a cabo mediante aloinjertos de MEC, que fueron preparados siguiendo una modificación del protocolo de descelularización propuesto por Sondell y colaboradores.<sup>19</sup> En el estudio se analizaron los siguientes grupos: 1) Sham (control), 2) Autoinjerto, 3) Aloinjerto de MEC y 4) Aloinjerto de MEC recelularizado con CMM-TA alogénicas diferenciadas *in vitro* a CtS. Al cabo de 15 semanas, en el análisis funcional, se observó una tendencia de

mejoría en los grupos 3 y 4, siendo superiores al autoinjerto (grupo 2). Respecto a los hallazgos morfológicos analizados, se observó que los grupos 3 y 4 presentaron una diferencia estadísticamente significativa respecto a la remielinización en el cabo proximal; y en el cabo distal, los grupos 2 y 3 evidenciaron una remielinización menor en comparación con el grupo control; mientras que, la diferencia frente al grupo 4 no fue estadísticamente significativa. Aunado a este análisis, se comparó la remielinización en el cabo distal de los grupos experimentales 3 y 4 respecto al estándar de oro (grupo 2) y se observó que el grupo 4 presentó una diferencia estadísticamente significativa; lo cual, demuestra la superioridad regenerativa del aloinjerto recelularizado, bajo estas condiciones experimentales.<sup>36,37</sup>

El siguiente ensayo escaló el modelo animal a ovinos, siendo un estudio piloto se evaluó la capacidad regenerativa y funcional de un xenoinjerto de origen humano, recelularizado *in vitro* con CtS alogénicas en una lesión de nervio ciático de 20 mm comparado con el autoinjerto, siendo evaluadas a seis meses. Se observó que efecto regenerativo y funcional en ambos grupos fue similar; aunque concluyó que se requieren de más experimentos, con un mayor número de modelos animales para evaluar la posible regeneración completa.<sup>38</sup>

### **2.3 Originalidad**

- 1) A nivel nacional no existe un Banco de Tejidos que produzca injerto acelular de nervio con la finalidad de reparar las LNP.
- 2) Los aloinjertos nerviosos comerciales disponibles son importados, tienen un costo elevado, fuera del alcance de la mayoría de la población.
- 3) Las técnicas para diferenciar, cultivar y expandir CS requieren más de 30 días.
- 4) Este estudio utilizará una nueva técnica de descelularización y recelularización del nervio alogénico.

### **2.4 Justificación**

- 1) En las LNP las terapias convencionales de reparación permiten una recuperación parcial de la función de la extremidad.
- 2) Los autoinjertos de nervio presentan disponibilidad limitada y pueden asociarse con secuelas de tipo sensitivo-motor.
- 3) La pre-diferenciación celular de CMM-TA a CtS permite disminuir los tiempos terapéuticos.
- 4) En el Banco de Hueso y Tejidos de la UANL podemos producir aloinjertos de nervio descelularizados para su aplicación en la clínica.

## **2.5 Meta del Estudio**

- 1) Se pretende obtener un aloinjerto ANA seguro y eficaz que permita la regeneración nerviosa.
- 2) Identificar que la técnica de recelularización del aloinjerto sea exitosa en el receptor.
- 3) Comprobar que a los doce meses de seguimiento haya una recuperación funcional completa de la extremidad afectada en los modelos ovinos.

## CAPÍTULO III

### 3. HIPÓTESIS

Un aloinjerto descelularizado y recelularizado con células madre mesenquimales alogénicas derivadas de tejido adiposo (CMMA-TA) pre-diferenciadas *in vitro* a CtS, es capaz de regenerar el nervio después de una LNP y recuperar la funcionalidad en la extremidad en un modelo ovino comparado con el AU.

## **CAPÍTULO IV**

### **4. OBJETIVOS**

#### **4.1 Objetivo General**

Evaluar la capacidad regenerativa y funcional de un aloinjerto recelularizado con CMMA-TA, pre-diferenciadas *in vitro* a CtS en una LNP de un modelo ovino, en comparación con un AU a los doce meses de seguimiento.

#### **4.2 Objetivos Específicos**

- 1) Preparar un andamio acelular a partir de nervio cadavérico ovino que conserve los componentes esenciales de la MEC.
- 2) Injertar el andamio acelular en el modelo ovino y recelularizarlo con CMM-TA pre-diferenciadas a CtS.
- 3) Comparar la recuperación de la función y el grado de regeneración nerviosa del AR a los doce meses de seguimiento con respecto al AU.

## CAPÍTULO V

### 5. MATERIAL Y MÉTODOS

#### 5.1 Diseño del estudio y estrategia general

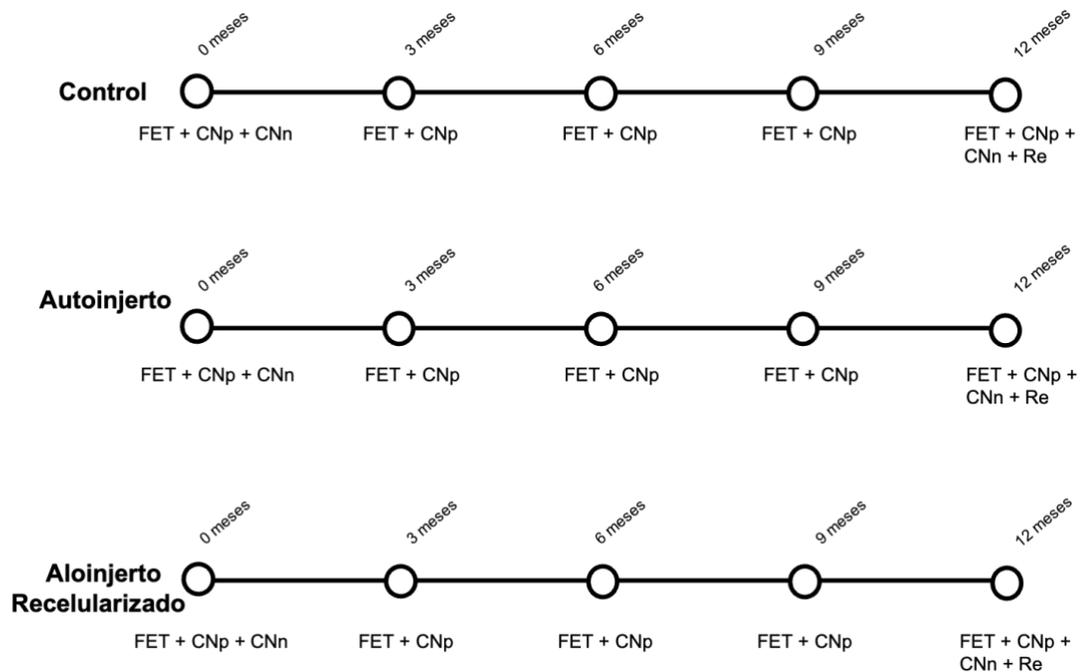
Este fue un ensayo pre-clínico controlado, prospectivo, longitudinal, aleatorizado y no ciego. El estudio consistió de dos etapas *in vitro* e *in vivo*. En la etapa 1) *in vitro* se realizó: a) la preparación del andamio, y la pre-diferenciación de CMMA-TA a CtS y en la etapa 2) *in vivo* se realizó el trasplante del injerto en los modelos animales. Ambas etapas fueron evaluadas histológicamente y en ésta última se incluyeron evaluaciones funcionales y de conducción nerviosa seriadas. La estrategia general se esquematiza en la figura 1.



**Figura 1. Estrategia general.** La etapa 1 se realizó *in vitro*, para cumplir con nuestros primeros dos objetivos a) la preparación del andamio, que involucró la descclularización del nervio peroneo ovino, con su debido análisis histológico y b) el aislamiento y caracterización de CMM a partir de tejido adiposo pectoral y la pre-diferenciación de CMM-TA a CtS. La etapa 2 se realizó *in vivo*, para cumplir con nuestro tercer objetivo. Los ovinos se dividieron en dos grupos de siete, los nervios peroneos derechos fueron los controles (sham) y los izquierdos, los trasplantados con un autoinjerto (AU) o con un aloinjerto recelularizado (AR). Se realizaron evaluaciones seriadas (cero, tres, seis, nueve y doce meses) de la marcha para evaluar la funcionalidad de la extremidad trasera (FET), y evaluaciones seriadas de conducción nerviosa en piel (CNp) y directamente en el nervio (CNn) para evaluar la regeneración. A los doce meses se recolectaron los nervios para su análisis histológico.

## 5.2 Modelo animal

Se incluyeron al azar catorce ovinos en dos grupos de siete ( $n = 7$ ). Se realizó una lesión del nervio peroneo de 30 mm de longitud y posteriormente fue reparada mediante el trasplante de un AU o un AR con CtS. Se evaluó la recuperación funcional de la extremidad (apoyo y marcha) y la regeneración nerviosa mediante pruebas de conducción nerviosa y los análisis histomorfológico e histomorfométrico de los injertos. Todas las evaluaciones se compararon con la extremidad trasera contralateral. Se esquematiza una línea de tiempo del estudio (Fig. 2).



**Figura 2. Cronología esquemática del estudio.** Se muestran todos los grupos tratados en el modelo animal. Los controles se sometieron a cirugía simulada (sham) en la extremidad trasera derecha. Se realizó una lesión nervio peroneo de 30 mm de longitud en las extremidades posteriores izquierdas: el grupo de autoinjerto se sometió a una cirugía de nervio inverso y el grupo del AR recibió un aloinjerto de nervio acelular (ANA) inyectado con  $3 \times 10^5$  CtS/  $\mu$ l para su reparación. El seguimiento fue a los cero, tres, seis, nueve y doce meses con las evaluaciones de la función de las extremidades traseras (FET), la conducción nerviosa en la piel (CNp) y la conducción nerviosa directamente en los nervios (CNn). La recolección de los nervios (Re) fue a los 12 meses después de la cirugía para su respectivo análisis histológico.

### 5.2.1 Consideraciones éticas y criterios de selección

Todos los experimentos se realizaron de acuerdo y bajo un protocolo aprobado por el Comité de Ética en Investigación, el Comité de Investigación, el Comité de Bioseguridad y el Comité Institucional para el Cuidado y Uso de

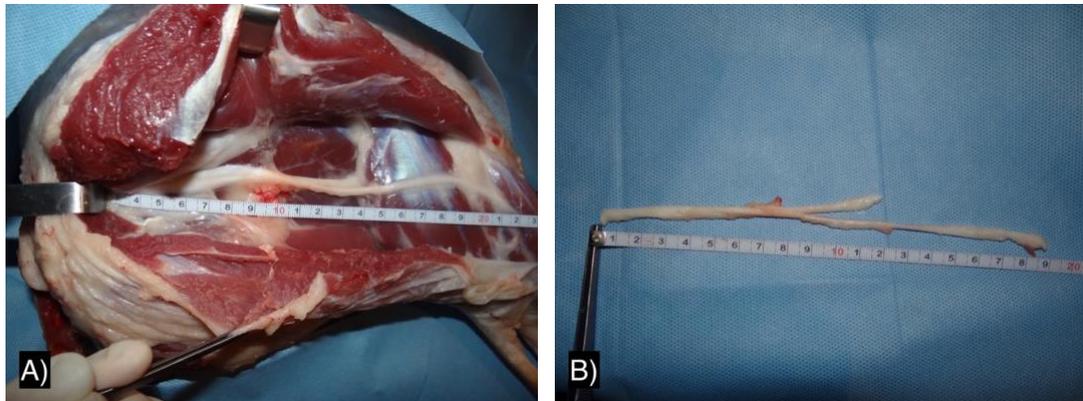
Animales de Laboratorio (CICUAL) de nuestra institución (número de protocolo OR17-00001). Este estudio contó con un apoyo por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) del programa Problemas Nacionales, no. de proyecto: PN-2017/6583. Durante el diseño del estudio, se analizó cuidadosamente el riesgo de posible sesgos.<sup>39</sup> Los animales incluidos fueron ovinos Pelibuey hembras ( $\approx 25$  kg,  $\approx 6$  meses de edad), adquiridas en la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de nuestra institución, donde fueron estabulados con acceso *ad libitum* al agua y alimentados diariamente. Se excluyeron los ovinos que presentaran una marcha anormal previa a la cirugía.

Conforme a las disposiciones de la Norma Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999. Especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio<sup>40</sup>: en el establo se contaba con un Médico Veterinario Zootecnista y auxiliares técnicos, responsables del cuidado y bienestar de los animales. Para el manejo de los animales en el laboratorio se utilizaron guantes y se portó uniforme quirúrgico o bata; siguiendo las recomendaciones de la Norma se tomó el apartado de porcinos en referencia a los animales de abasto incluyendo éste a los ovinos, los cuales: a) fueron mantenidos en corrales equipados con comedero y bebedero de alimentación automática y con ventilación adecuada b) los corrales se limpiaron y se reemplazaron las camas mojadas diariamente. Una vez al mes fueron evacuados los corrales. Los pisos, paredes, jaulas y utensilios fueron

remojados con solución desinfectante y fueron lavados con agua a presión c) todos los días se observaron los animales para detectar cambios de comportamiento, enfermedades, heridas o muerte d) durante el estudio, fueron identificados mediante perforaciones y muescas en las orejas derechas de acuerdo a un código preestablecido por nuestro equipo.

### **5.2.2 Cálculo del tamaño de la muestra**

El tamaño de la muestra se determinó, mediante una hipótesis y una prueba de diferencia de dos medias según Wang et al.<sup>41</sup> La velocidad de conducción de los nervios peroneos injertados con o sin CMM, se comparó con un valor  $z\alpha$  de 1.96 y un nivel de significancia del 95% para dos colas y se analizó un valor  $z\beta$  de 0.84 con una potencia del 80% y se obtuvo una muestra de 7 unidades por grupo. Un ovino adicional fue requerido para recolectar tejido adiposo pectoral para el posterior aislamiento de las CMM y su posterior pre-diferenciación en CtS y para obtener nervios peroneos y tibiales bilaterales (Fig. 3), para la preparación del ANA.



**Figura 3. Procuración de nervio donador.** De un ovino adicional, se procuró tejido adioso pectoral (para la obtención de CMM-TA y pre-diferenciación a CtS) y A) nervio ciático bilateral (para el ANA). B) Nervio ciático con sus ramas tibial y peroneas.

### 5.3 Preparación del Aoinjerto

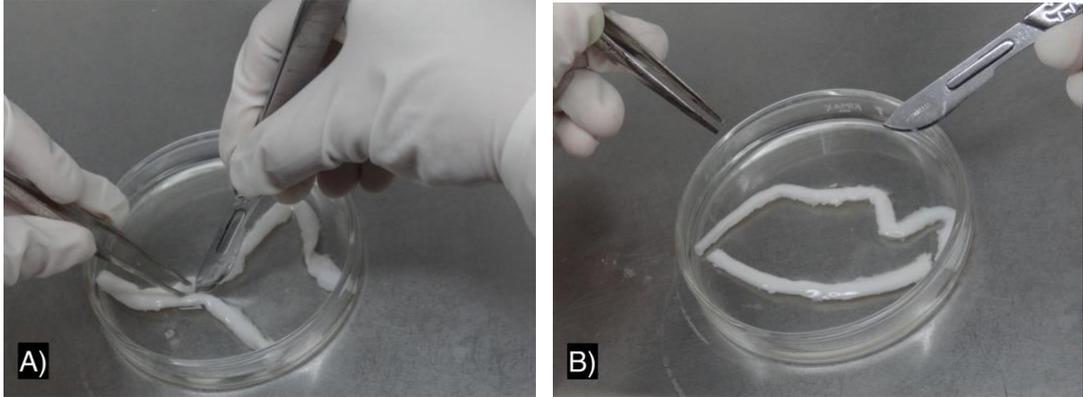
#### 5.3.1 Aislamiento y caracterización de CMM-TA alogénicas

El tejido graso y los nervios peroneos y tibiales del ovino adicional se mantuvieron en tubos cónicos de 50 ml, etiquetados individualmente con solución amortiguadora de fosfatos (PBS, phosphate buffered saline) 1X suplementada con 50  $\mu\text{g/ml}$  de gentamicina y penicilina-estreptomicina (Gibco®, Grand Island, NY, 14072) y 2.5  $\mu\text{g/ml}$  Fungizone® (Gibco®) para la recolección de CMM-TA y para la preparación del aoinjerto. Luego, en condiciones estériles se realizó el aislamiento, el cultivo primario, la

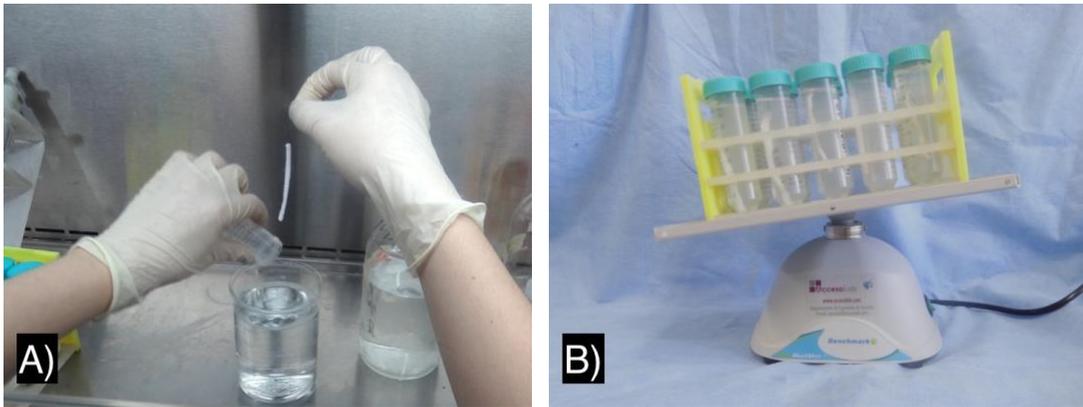
expansión y la caracterización inmunocitoquímica (ICQ) de las CMMA-TA (marcadores de selección positivos CD-90: 100µg c2441-60 y CD-105: 200µg c2446-55). Los anticuerpos primarios se adquirieron de US Biological y el sistema de detección Mouse and Rabbit Specific HRP / DAB ab64264 se adquirió de Abcam® (Cambridge, Reino Unido); estos procedimientos se realizaron según lo descrito por García-Pérez *et al.*<sup>36</sup> Los medios y las soluciones para el cultivo celular se encuentran en el anexo 9.1

### **5.3.2 Preparación del ANA**

Posteriormente, los nervios peroneo y tibial se debridaron y se dividieron en fragmentos de 40-60 mm en condiciones estériles (Fig. 4) y se descelularizaron con una técnica basada en sulfobetaínas<sup>42</sup> y condroitinasa ABC (Fig. 5).<sup>43</sup> Después de cinco días de descelularización, los injertos se conservaron en PBS 1X, pH 7.4 a 4° C hasta el día quirúrgico. Para la eliminación exitosa de los componentes celulares y la preservación de los componentes de la MEC (fibras de colágeno y lámina externa) en el ANA, se realizaron tinciones histológicas con hematoxilina y eosina (H&E) y Tricrómico de Masson modificado (TCM-M); estas tinciones permiten identificar la MEC y el colágeno, respectivamente. El ANA se comparó contra un nervio peroneo fresco (a 4°C) y contra un nervio congelado y descongelado (de -80°C a 25°C).



**Figura 4. Debridación de nervio.** A) Se realizó debridación del tejido nervioso bajo técnica estéril en campana de flujo laminar. B) El nervio ciático fue dividido en sus ramas tibial y peronea.



**Figura 5. Descelularización de nervio.** A) Se realizaron cambios periódicos de PBS, Buffer de lavado, Buffer de extracción, sulfobetainas SB-10 y S-16 y se agregó condroitinasa. B) Se mantuvieron en agitación constante.

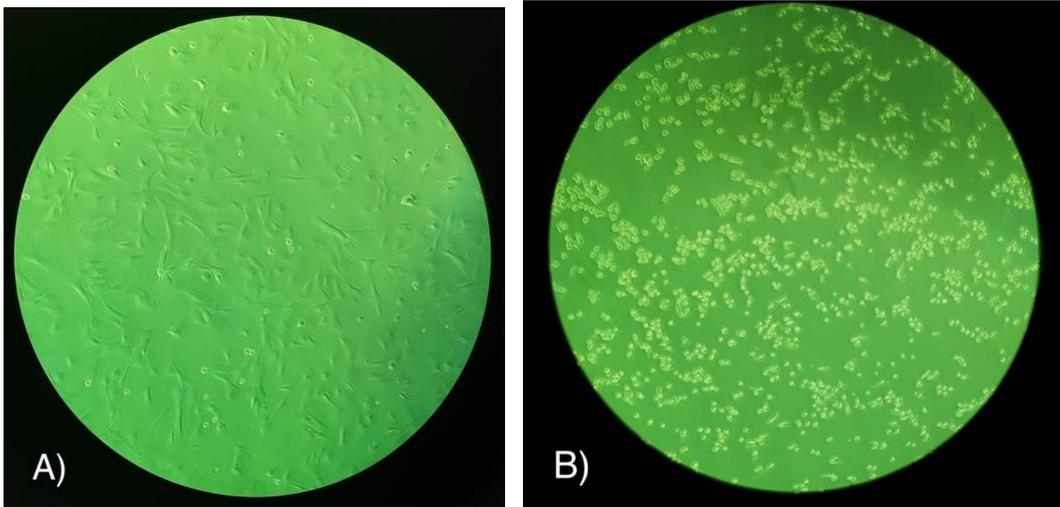
Se realizó también histoquímica con ácido periódico-Schiff (PAS)<sup>44</sup>, Klüver-Barrera (KB)<sup>45</sup> y Marsland-Glees-Eriksson (MGE).<sup>46</sup> Presentan una afinidad selectiva por los polisacáridos de la lámina externa (indicando la integridad de la MEC), por los lípidos de la vaina de mielina y por los axones, respectivamente. Las muestras se analizaron mediante microscopía óptica con un microscopio Nikon Eclipse 50i y el software NIS-Elements Advanced Research Digital Sight DDS-2Mu para el análisis de imágenes.

### **5.3.3 Pre-diferenciación de CMM-TA a CtS**

Para la recelularización de ANA, en el día quirúrgico, las CMM-TA se incubaron a 37°C en una atmósfera de CO<sub>2</sub> al 5% y se expusieron durante cinco horas en un medio de cultivo celular con factores de crecimiento específicos que promovieron la pre-diferenciación en CtS en frascos para cultivo celular de 75 cm<sup>2</sup> (Fig. 6). Siendo esto una modificación de la técnica descrita por García-Perez *et al.*<sup>36</sup>

Previamente se realizó un análisis ICQ en una muestra para identificar la positividad a la proteína S-100 (1: 1500) Dako Cytomation, Inc® (Carpinteria, Ca; EE. UU.) expresada por CtS.<sup>47</sup> Luego, las CtS se entregaron directamente en el quirófano, en donde se inyectaron 3 x 10<sup>5</sup>

células / $\mu$ l con > 96% de viabilidad en los ANA, sólo en el grupo de AR. La cantidad de células inyectadas en el ANA se estimó según lo descrito por Gersey *et al.*<sup>27</sup> y por García-Pérez *et al.*<sup>36</sup>

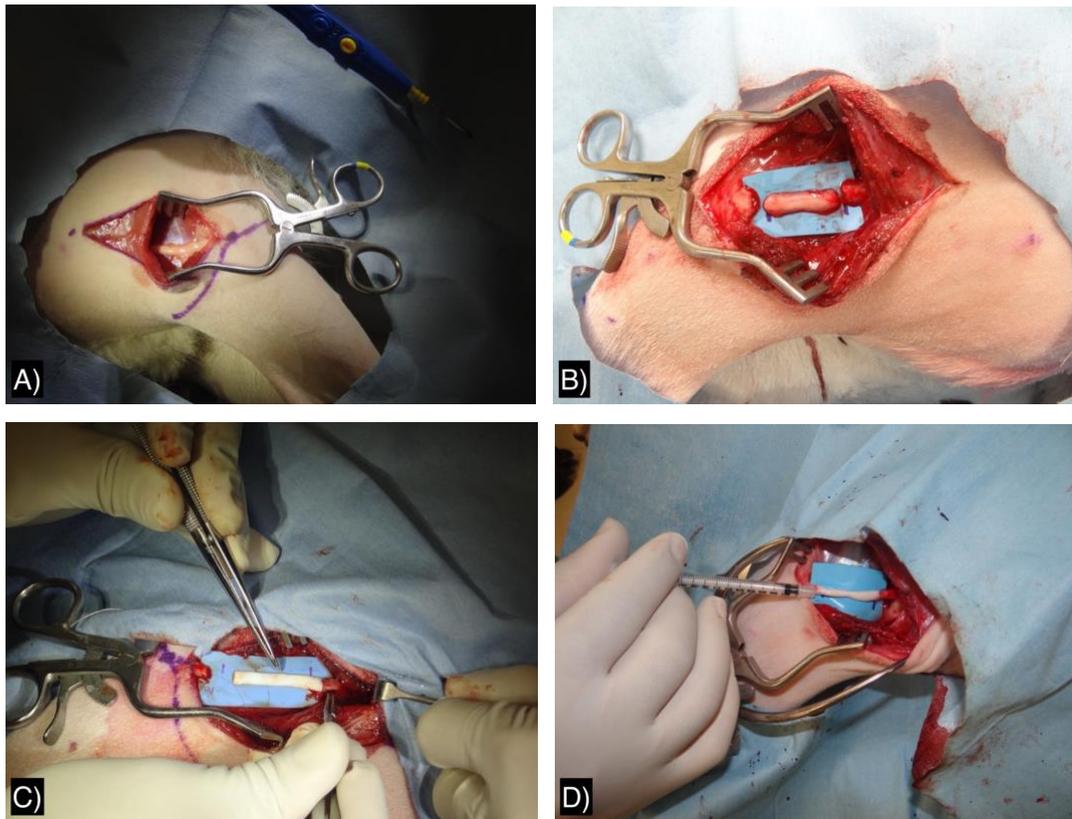


**Figura 6. Pre-diferenciación de CMM-TA a CtS.** A) CMM-TA inducidas por cinco horas con factores de crecimiento específicos para su pre-diferenciación a CtS en frascos para cultivo celular de 75 cm<sup>2</sup>. B) CMM-TA con tripsina-EDTA al 25% para inhibir la adhesión celular y permitir su transferencia a jeringas de 0.5 ml. Aumento 100x.

#### 5.4 Cirugía del nervio peroneo y trasplante alogénico de CtS

Los ovinos tuvieron ayuno de 24 horas para poder ser sedados por vía intravenosa con ketamina (5 mg/kg) y xilacina (0.5 mg/kg) y se mantuvieron anestesiados por inhalación endotraqueal con isoflurano al 3% y oxígeno (2 l/min) en posición lateral. Se realizó el tricotomía y asepsia de ambas

extremidades traseras. Luego, se realizó una incisión por planos hasta exponer el nervio peroneo (NP) izquierdo a partir de un acceso transfemoral lateral y caudal (Fig. 7 A) y se disecó con instrumentos microquirúrgicos, creando un defecto nervioso de 30 mm de longitud (Fig. 7 B). En el grupo del AU, el nervio se rotó 180°; en el grupo de AR, se injertó el ANA (Fig. 7 C) y se inyectaron CtS a través de una jeringa de 0.5 ml (Fig. 7 D). Se realizó neurorrafia microquirúrgica con sutura monofilamento no absorbible 9-0 (Atramat® Ciudad de México, MX.) y posteriormente la herida fue cerrada por planos. Las extremidades traseras derechas también se intervinieron quirúrgicamente, se identificó el NP y se emplearon como grupo de control (sham). El mismo cirujano realizó todos los procedimientos quirúrgicos.



**Figura 7. Cirugía del NP y trasplante alogénico de CtS.** A) Identificación del NP (extremidad trasera derecha; grupo control) B) Lesión nerviosa de 30 mm. En el grupo AU; el nervio se invirtió y se suturó microquirúrgicamente (extremidad trasera izquierda). En el grupo AR; el injerto fue previamente C) descelularizado, luego, microquirúrgico suturado y D) infiltrado con  $3 \times 10^5$  CtS/ $\mu$ l (extremidad trasera izquierda).

El manejo posoperatorio (Fig. 8) de los ovinos incluyó una estrecha vigilancia de la anestesia, incluyendo el manejo del dolor (flunixin meglumina 83 mg/ ml; 1 ml/40 kg) y antibioticoterapia (clindamicina 100 mg/ml y gentamicina 50 mg/ml; 1 ml/10 kg) por vía intramuscular cada 24 horas por 3 días. Además, se utilizó una férula hecha a mano de cloruro de polivinilo (PVC, *polyvinylchloride*) durante aproximadamente 4 semanas para evitar la lesión del nervio injertado y para facilitar la rehabilitación. Todos los ovinos sobrevivieron a la cirugía sin complicaciones.



**Figura 8. Manejo postoperatorio.** A) Postoperatorio inmediato de los ovinos, con vigilancia estrecha postanalgésica y B) en estabulación con su respectiva férula de PVC posterior en la extremidad con injerto de nervio (izquierdas).

## 5.5 Evaluación de la funcionalidad

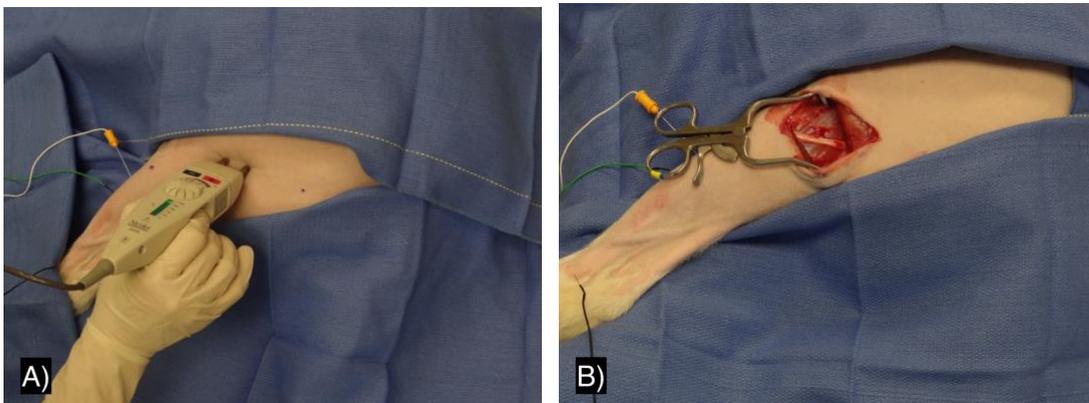
La funcionalidad de la extremidad se evaluó mediante la marcha, se registraron videos y fotografías seriadas a los cero, tres, seis, nueve y doce meses después de la cirugía. Se adaptó una escala de patrones básicos de movilidad de la funcionalidad de la marcha <sup>48</sup> para los ovinos (Fig. 9).



**Figura 9. Evaluación inicial de la funcionalidad.** Se capturaron imágenes y video para evidenciar marcha de los ovinos. Fotografía de ovino inicial, a los cero meses.

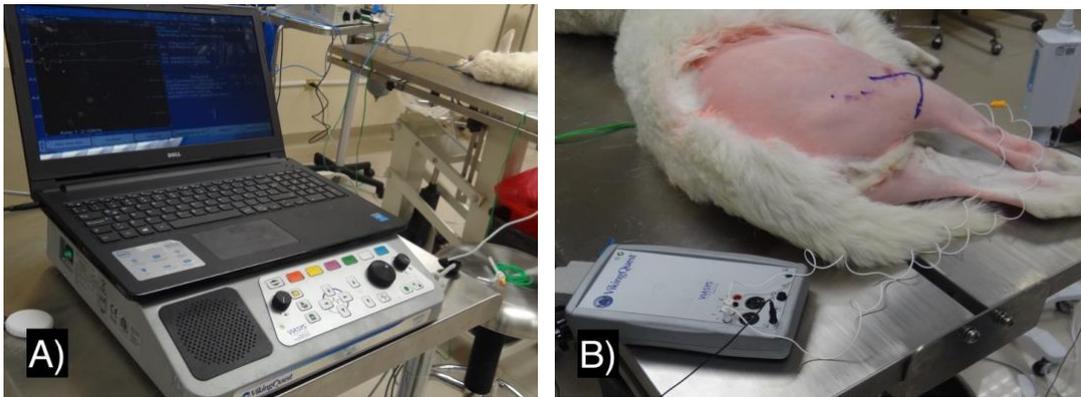
## 5.6 Evaluación de la conducción nerviosa

La conducción nerviosa bilateral se cuantificó a través de la piel y directamente en el nervio. Las pruebas de neuroconducción cutáneas se realizaron periódicamente bajo sedación en el quirófano al mismo tiempo que las evaluaciones de la marcha. La estimulación cutánea se realizó con estimulador bipolar (ánodo y cátodo) hasta la neurorrafia proximal (pre-lesión) y luego distal a ella (post-lesión) (Fig. 10 A). Las pruebas de neuroconducción directas en el nervio se realizaron sólo a los cero y doce meses después de la cirugía. Los electrodos se colocaron de la misma manera que para la prueba cutánea, con la diferencia del estimulador, que era monopolar (Fig. 10 B).



**Figura 10. Evaluación de la conducción nerviosa.** Se envía un estímulo con impulsos eléctricos a través de A) la piel (pruebas cutáneas) o B) directamente en el NP. Luego, el electrodo / cátodo activo (el cable blanco) y su referencia / ánodo (el cable verde) registran la actividad del músculo peroneo. El electrodo de la tierra es el cable negro en el maleolo de la tibia.

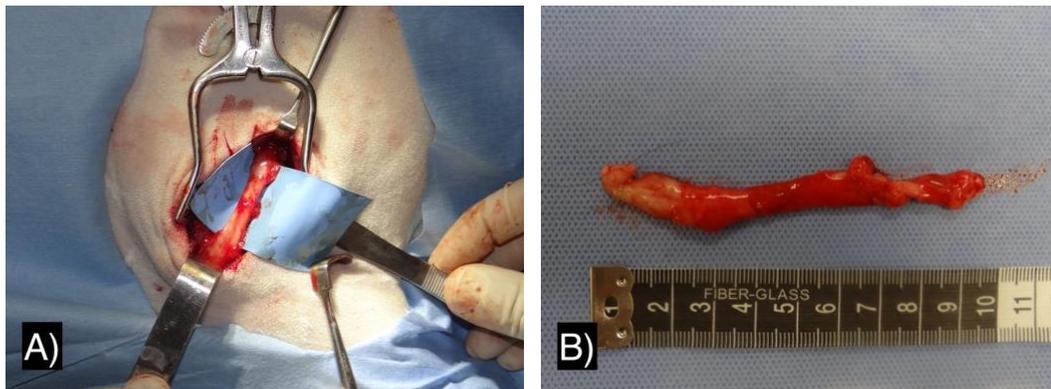
En ambas pruebas, se administró un estímulo de 34 V (estímulo supramáximo). Se registró latencia (mide el tiempo de conducción), la amplitud (evaluó los potenciales de acción) y la velocidad de conducción (es la distancia entre los estímulos pre-lesión y post-lesión (30 mm) sobre la latencia) del músculo peroneo, siendo esto bilateral y en ambos grupos de estudio. El mismo especialista terapéutico realizó todas las pruebas de conducción nerviosa con un sistema Nicolet® VikingQuest™ (Nicolet Instrument Corp, Middleton, WI) y fue ciego a los grupos de estudio (Fig. 11).



**Figura 11. Equipo para la neuroconducción.** A) Sistema Nicolet® VikingQuest™ (Nicolet Instrument Corp, Middleton, WI) B) Prueba de neuroconducción cutánea en extremidad trasera derecha a los cero meses.

## 5.7 Evaluación histológica

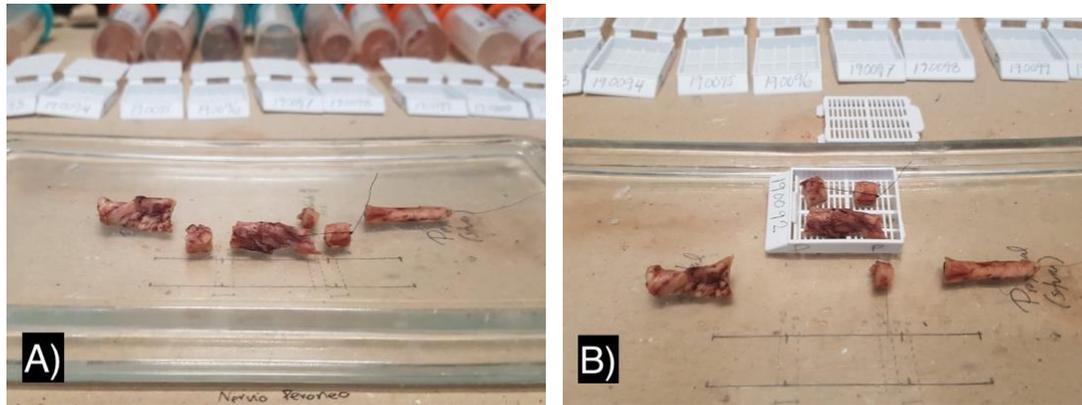
Después de doce meses de seguimiento, los animales fueron sacrificados con pentobarbital sódico intravenoso (90 - 210 mg/kg). La eutanasia química se confirmó por la ausencia de signos vitales. Se recolectaron los nervios peroneos bilaterales de cada animal (Fig. 12)



**Figura 12. Recolección de nervio peroneo.** Se procuraron los nervios peroneos de todos los grupos para su análisis histológico a los doce meses. A) nervio peroneo izquierdo de ovino en el grupo del autoinjerto. B) El mismo nervio procurado. La porción proximal fue suturada para mantener identificada la orientación del nervio.

Los nervios recolectados se fijaron en glutaraldehído al 4% y posteriormente se procesaron mediante técnica histológica convencional, orientando el tejido para obtener cortes longitudinales y axiales y manteniendo la orientación proximal y distal del nervio (Fig. 13). El espesor del tejido en las laminillas para su análisis histológico varió según la tinción a

realizar (4 $\mu$ m para H&E, TCM-M y PAS; 7 $\mu$ m para KB; 10  $\mu$ m para MGE; 350 nm para azul de toluidina).



**Figura 13. Nervio peroneo fijado.** El tejido nervioso se fijó en glutaraldehído al 4% y se trabajó en campana de extracción de gases. A) Nervio peroneo seccionado para su análisis con técnica histológica convencional, en sus porciones B) proximal y distal y en cortes axial y longitudinal en cassettes. Para mantener la dirección del nervio, se suturaron nuevamente las porciones proximales y se señaló en el cassette.

La evaluación histológica consistió de a) una descripción detallada de los hallazgos bajo el microscopio óptico (morfología) y b) una cuantificación de la intensidad densitométrica de cada tinción realizada (morfometría). Las técnicas morfológicas para el NP se describen en el anexo 9.2.

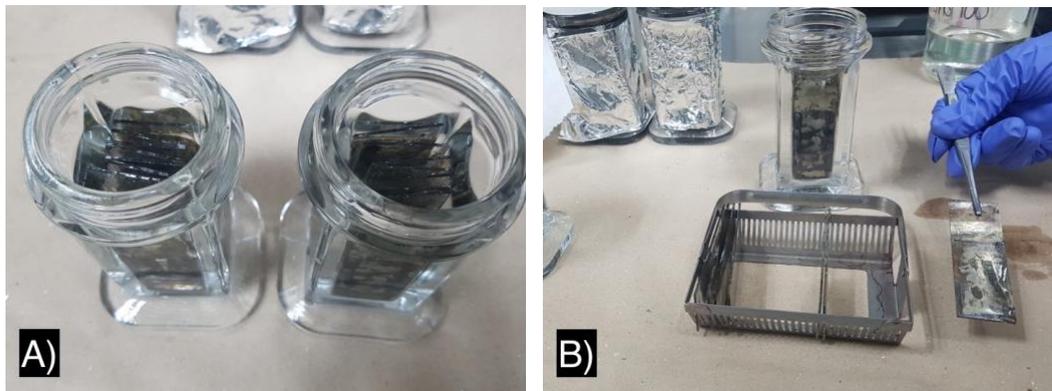
Para la histomorfología, se realizó la tinción con con H&E, con la finalidad de observar la morfología general y evaluar la organización de las fibras nerviosas. Se empleó una escala y se calificó según el grado de organización de las fibras (3 puntos = buena, 2 puntos = regular, 1 punto = mala organización) para las porciones proximales y distales en los cortes

longitudinales de los nervios. Con las tinciones de TCM-M, PAS, KB y MGE se identificó la MEC y el colágeno, la integridad de MEC, la mielina y la regeneración axonal, respectivamente. Además, se realizó inmunohistoquímica (IHQ) para identificar la positividad a la proteína S-100 (1:1500, Dako Cytomation, Inc®; Carpinteria, Ca; EE. UU.) en los cortes axiales, con el fin de confirmar la presencia de CS en todos los grupos estudiados. La inmunocitoquímica e inmunohistoquímica se describen en el anexo 9.3.

Para la histomorfometría, se cuantificó la intensidad densitométrica de cada tinción. Se capturaron ocho campos consecutivos con un aumento de 400x en los cortes longitudinales, por porción (proximal y distal) y se convirtieron en un archivo de 8 bits (escala de grises), se establecieron los parámetros de color, distribución tonalidad, saturación y luminancia según la tinción analizada, utilizando el software ImageJ versión 1.50i (U.S. NIH, Bethesda, MD) y el software GraphPad Prism® (San Diego, CA) para Macintosh.

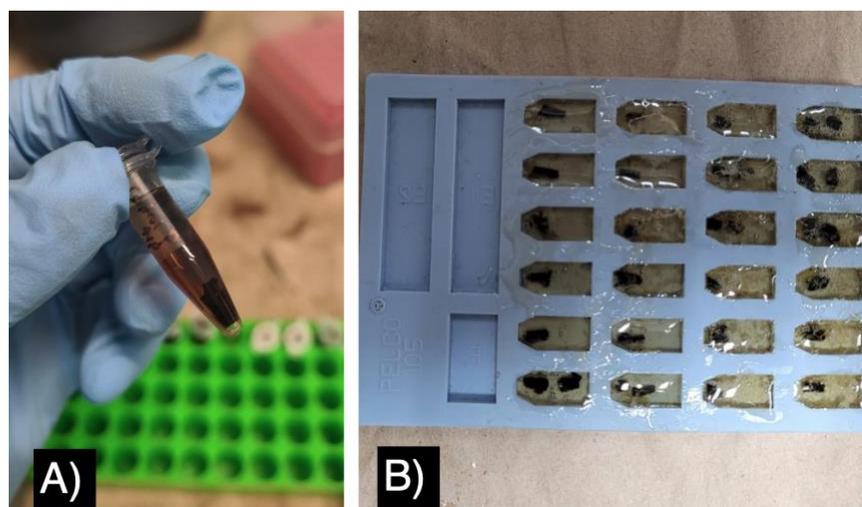
La regeneración axonal se analizó histomorfológica e histomorfométricamente. La impregnación argéntica de MGE fue empleada para identificar los axones y la vaina de mielina. Se calculó el área axonal en cinco cuadrículas aleatorias de 1.5 mm<sup>2</sup> cada una y se contabilizó el número de axones por cuadrícula en cada uno de los grupos, analizando ocho

campos consecutivos con un aumento de 400x en el corte axial de las porciones proximal y distal con la impregnación argéntica MGE (Fig.14).



**Figura 14. Impregnación argéntica con MGE.** A) Laminillas con NP dentro de frascos de Coplin para tinción de vidrio. B) NP impregnado con técnica argéntica, se observa la laminilla impregnada.

La posfijación con tetraóxido de osmio y la tinción con azul de toluidina nos permitió realizar microscopía electrónica de transmisión (con cortes semifinos de 350 nm) (Fig. 15).



**Figura 15. Posfijación con tetraóxido de osmio.** A) Tejido nervioso posfijado con tetraóxido de osmio en tubo eppendorf. B) Tejido con resina epoxi en molde de silicona. Se

mantuvo la orientación del NP para identificar las porciones proximales y distales de cada uno de los grupos.

## 5.8 Análisis estadístico

Los datos se expresaron como media y desviación estándar ( $\pm$  DE). Se utilizó el análisis de varianza (ANOVA) seguido del análisis *post hoc* de Tukey para determinar las diferencias estadísticas entre los grupos. Se empleó el software GraphPad Prism® (San Diego, CA) para Macintosh y el software ImageJ versión 1.50i (U.S. NIH, Bethesda, MD) para Macintosh para realizar el análisis histológico. La significancia estadística se definió como un valor de  $p < 0.05$ , y los resultados correspondientes se marcaron para la comparación entre los grupos injertados en comparación con los controles (\*) y para la comparación entre el mismo grupo respecto al tiempo (#).

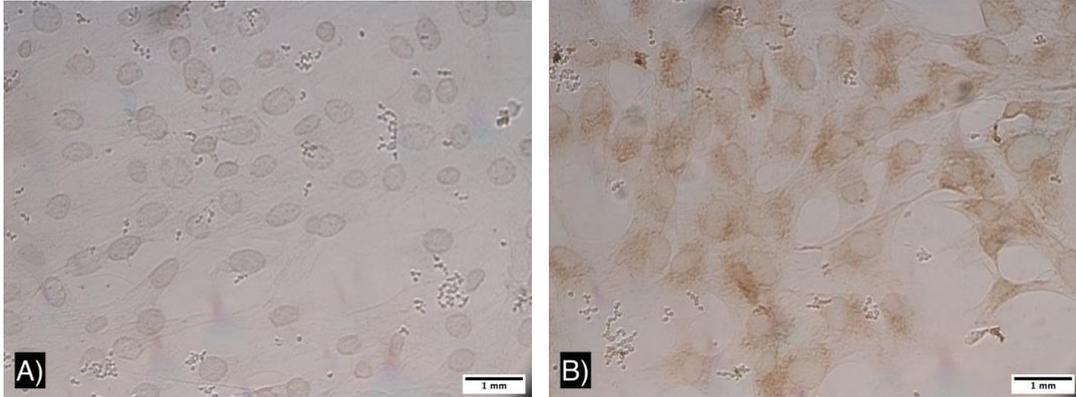
## **CAPÍTULO VI**

### **6. RESULTADOS**

#### **6.1 Aloinjerto Recelularizado**

##### **6.4.1. Caracterización de CMM-TA alogénicas y pre-diferenciación de CMM-TA a CtS**

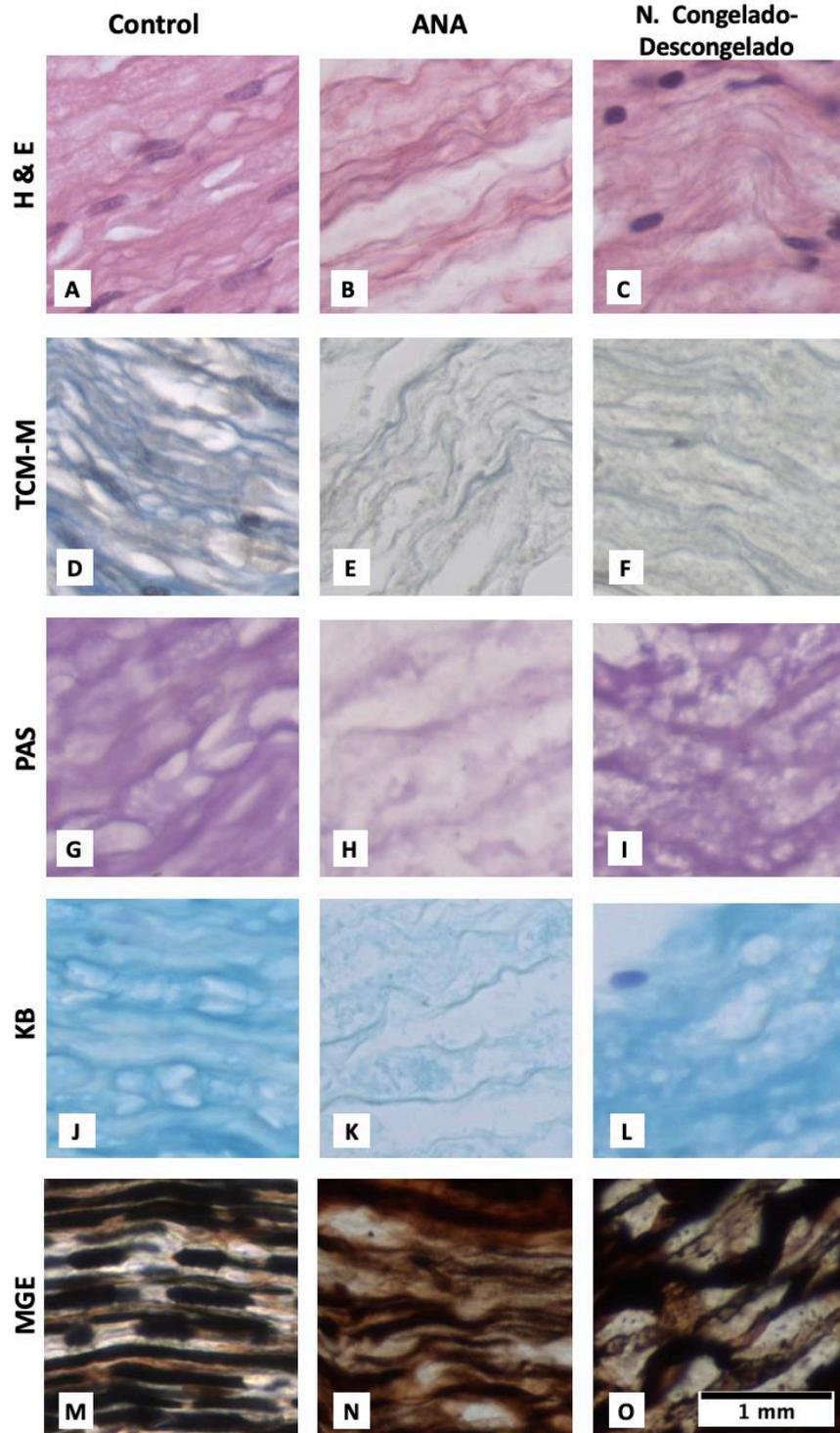
La caracterización de CMM-TA fue exitosa, se observó una positividad del 88% y el 73% para los marcadores CD-90 y CD-105, respectivamente. Además, se identificó una positividad > 70% para el marcador S-100 a las cinco horas de inducción en las CMM-TA, identificando una transdiferenciación exitosa a CtS (Figura 16).



**Figura 16. ICQ con S-100.** Se empleó para evaluar la pre-diferenciación de CMM-TA a CtS. A) CMM-TA con medio de cultivo completo. B) Se observa una positividad > 70% (tinción marrón) después de las cinco horas de exposición con factores de crecimiento para inducir a CtS. Aumento 400x.

#### 6.4.2. Aloinjerto nervioso acelular

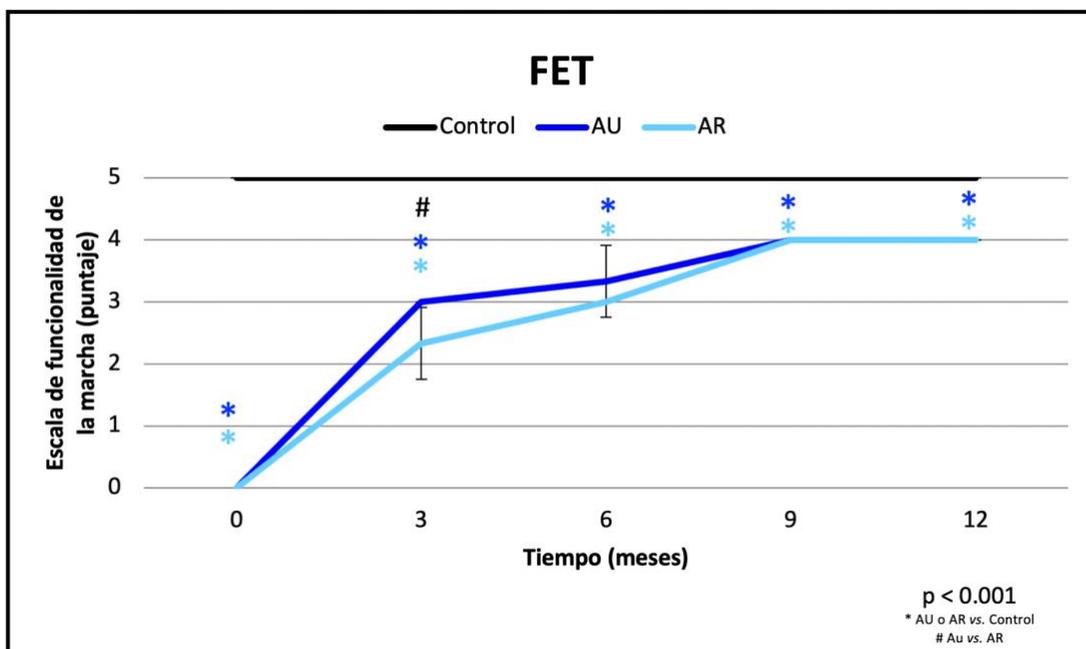
El análisis morfológico reveló que el método de descelularización eliminó de manera eficiente (> 90%) elementos celulares, citoplasma y mielina en el andamio. Además, los tejidos conectivos y la lámina externa se conservaron satisfactoriamente en comparación con los controles y con el nervio congelado-descongelado (Fig. 17).



**Figura 17. Análisis morfológico del nervio descelularizado.** En todas las tinciones (filas) del tejido nervioso se observó una descelularización satisfactoria del injerto (segunda columna) en comparación con el control (primera columna) y con el nervio descelularizado mediante congelación y descongelación (tercera columna). En el ANA, la MEC se conservó (E y H), la vaina de mielina estaba ausente (K) y la integridad axonal se interrumpió (N), siendo esto lo esperado. Aumento 400x.

## 6.2. Funcionalidad de la Extremidad

La función de la extremidad trasera (FET) tuvo una mejoría estadísticamente significativa ( $p < 0.001$ ) en ambos grupos de injerto a los seis (AU:  $3.3 \pm 0.6$ ; AR:  $3.0 \pm 0.0$ ), nueve (AU:  $4.0 \pm 0.0$ ; AR:  $4.0 \pm 0.0$ ) y doce meses (AU:  $4.0 \pm 0.0$ ; AR:  $4.0 \pm 0.0$ ), en comparación con los valores de control inicial posquirúrgicos (AU:  $1.0 \pm 0.0$ ; AR:  $1.0 \pm 0.0$ ). A los tres meses, se observó que el grupo del AU presentó una mejoría más rápida que el grupo de AR ( $p < 0.01$ ). Sin embargo, no se observaron diferencias significativas cuando se compararon ambos grupos tratados en los meses siguientes (Fig. 18).

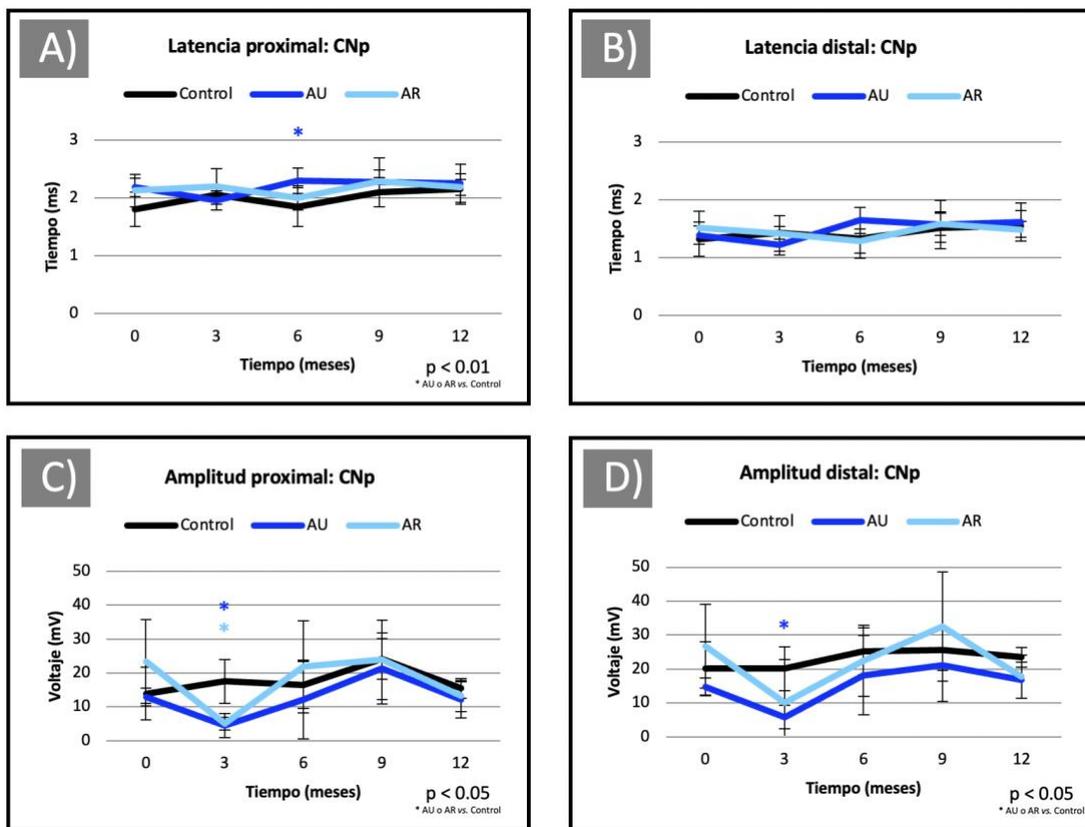


**Figura 18. Funcionalidad de la extremidad trasera (FET).** Se realizó un análisis de la marcha de todos los grupos con respecto al tiempo (meses) de evolución; de acuerdo a la adaptación a la escala de Perez-Parra, et al.<sup>48</sup> 5= capaz de realizar el patrón básico de movilidad dentro de parámetros normales, 4 capaz de ejecutar el patrón básico de movilidad de forma completa con mínima desviación, 3= capaz de ejecutar el patrón básico de movilidad de forma completa con marcada desviación del patrón normal, 2= capaz de ejecutar parcialmente el patrón básico de movilidad, 1= se esboza el patrón básico de movilidad, 0= incapacidad total de realizar el patrón básico de movilidad. Los datos se presentan como media  $\pm$  DE. Análisis ANOVA. \*  $p < 0.001$  diferencias entre los grupos con injerto en comparación con los controles. #  $p < 0.001$  diferencia entre los grupos con injertos (AU vs. AR).

### 6.3. Conducción nerviosa

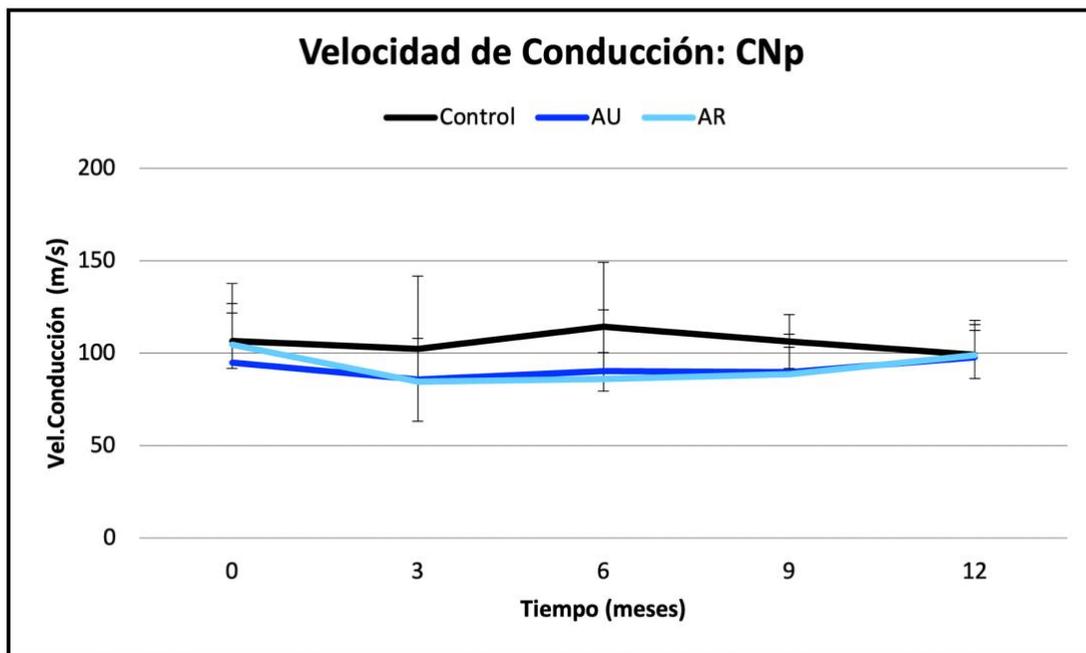
Las pruebas de conducción nerviosa en piel (CNp) revelaron una latencia prolongada estadísticamente significativa ( $p < 0.01$ ) en el nervio proximal (antes de la lesión) del grupo de autoinjerto ( $2.3 \pm 0.4$  ms) en comparación con los controles ( $1.8 \pm 0.3$  ms) a los seis meses posquirúrgicos (Fig. 19A). No se observaron diferencias en la latencia del nervio distal

(posterior a la lesión) (Fig. 19 B). La amplitud del nervio proximal disminuyó significativamente ( $p < 0.05$ ) en ambos grupos tratados (AU:  $4.4 \pm 2.1$  mV; AR:  $5.1 \pm 1.8$  mV) a los tres meses de la cirugía en comparación con los controles ( $17.5 \pm 4.4$  mV) (Fig.19 C). La amplitud distal disminuyó significativamente ( $p < 0.05$ ) sólo en el grupo del AU (AU:  $5.8 \pm 3.5$  mV) a los tres meses en comparación con los controles (AR:  $10.0 \pm 12.7$  mV; C:  $20.1 \pm 6.7$  mV) (Fig.19 D). No se observaron más diferencias estadísticamente significativas.



**Figura 19. Conducción nerviosa en piel (CNp).** Se registró periódicamente la latencia (A-B) y la amplitud (C-D) en sus porciones proximales (columna izquierda) y distales (columna derecha) de todos los grupos con respecto al tiempo (meses) de evolución. Los datos se presentan como media  $\pm$  DE. Análisis ANOVA. \*  $p < 0.01$  /  $p < 0.05$  diferencias entre los grupos con injerto en comparación con los controles.

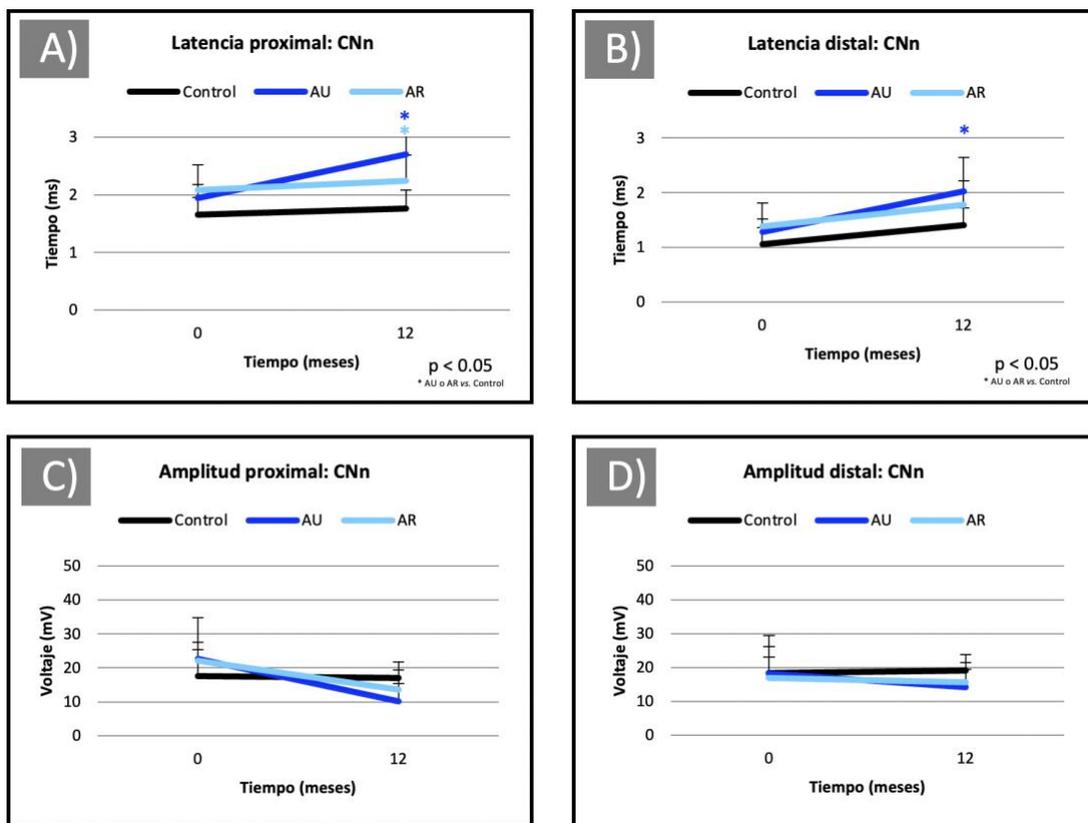
La velocidad de conducción nerviosa disminuyó en ambos grupos tratados a los tres (AU:  $85.7 \pm 22.1$  m/s; AR:  $84.7 \pm 23.3$  m/s), seis (AU:  $90.4 \pm 33.1$  m/s; AR:  $86.14 \pm 14.1$  m/s) y nueve meses (AU:  $89.8 \pm 20.3$  m/s; AR:  $88.7 \pm 14.5$  m/s) en comparación con los controles. Sin embargo esta disminución no fue estadísticamente significativa. A los doce meses, se alcanzaron valores similares en ambos grupos tratados en comparación con los controles (AU:  $97.7 \pm 17.6$ ; RA:  $99.0 \pm 18.6$ ; C:  $99.3 \pm 13.0$  m/s) (Fig. 20).



**Figura 20. Velocidad de conducción en piel.** Se comparó la velocidad de conducción del nervio mediante pruebas cutáneas de todos los grupos con respecto al tiempo (meses) de evolución. Análisis ANOVA. No se observaron diferencias estadísticamente significativas.

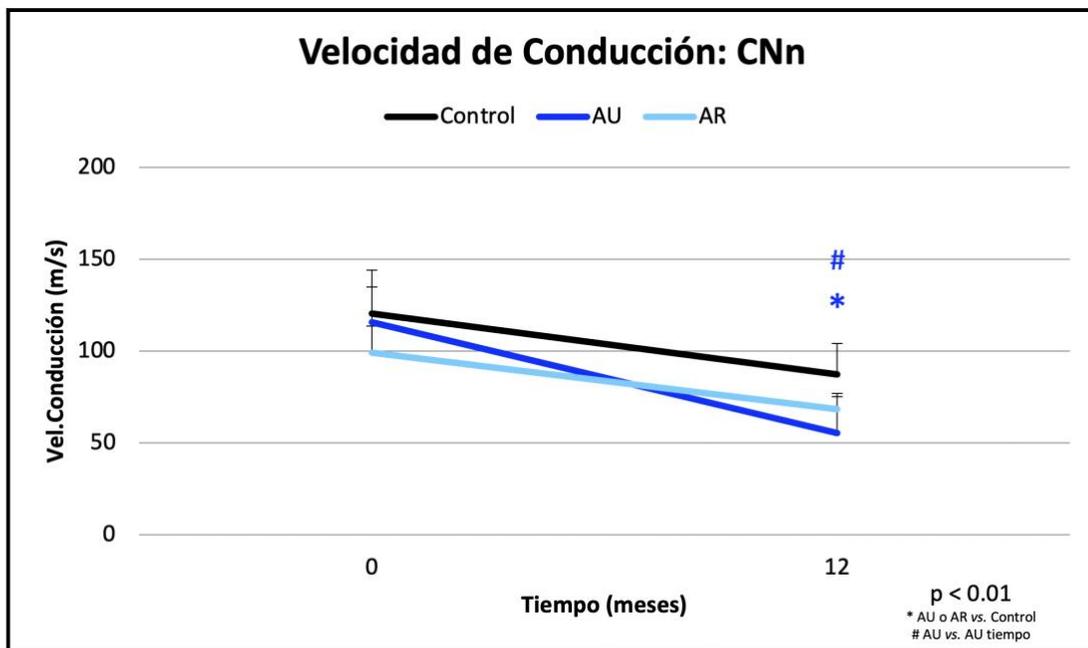
Las pruebas de conducción nerviosa en el nervio (CNn) demostraron una latencia prolongada en la porción proximal en ambos grupos de tratamiento (AU:  $2.7 \pm 0.5$  ms; AR:  $2.3 \pm 0.4$  ms) en comparación con los

controles ( $1.7 \pm 0.3$  ms) a los doce meses posteriores a la cirugía ( $p < 0.05$ ) (Fig. 21 A). La latencia del nervio distal se prolongó sólo en el grupo de AU ( $2.0 \pm 0.6$  ms) en comparación con los controles ( $1.4 \pm 0.3$  ms) a los doce meses después de la cirugía ( $p < 0.05$ ) (Fig. 21 B). La amplitud de los nervios proximal y distal se disminuyó en ambos grupos tratados en comparación con los controles a los doce meses posquirúrgicos; sin embargo, no se encontraron diferencias significativas ( $p > 0.05$ ) (Fig. 21 C y D).



**Figura 21. Conducción nerviosa en el nervio (CNn).** Se registró periódicamente la latencia (A-B) y la amplitud (C-D) en sus porciones proximales (columna izquierda) y distales (columna derecha) de todos los grupos con respecto al tiempo (meses) de evolución. Los datos se presentan como media  $\pm$  DE. Análisis ANOVA. \*  $p < 0.05$  diferencias entre los grupos con injerto en comparación con los controles.

La velocidad de conducción directamente en el nervio (CNn) disminuyó en ambos grupos tratados (AU:  $55.2 \pm 19.8$  m/s; AR:  $68.3 \pm 8.4$  m/s) a los doce meses en comparación con los controles ( $87.2 \pm 16.8$  m/s); sin embargo, sólo el grupo de autoinjerto tuvo una disminución estadísticamente significativa ( $p < 0.01$ ) en comparación con los controles y en comparación con los valores iniciales y finales (doce meses) (Fig. 22).



**Figura 22. Velocidad de Conducción en el nervio.** Se comparó la velocidad de conducción directamente en el nervio de todos los grupos con respecto al tiempo (meses) de evolución. Análisis ANOVA. \*  $p < 0.01$  diferencia entre los grupos con injerto en comparación con los controles. #  $p < 0.01$  diferencia entre el mismo grupo con respecto al tiempo.

Con la finalidad de concentrar visualmente los valores de las pruebas de conducción nerviosa en piel y directamente en el nervio a los doce meses, se realizó la Tabla 1.

**Tabla 1. Pruebas de CNp y CNn en el nervio peroneo.** El área analizada es la post-lesión (distal) a los doce meses de seguimiento.

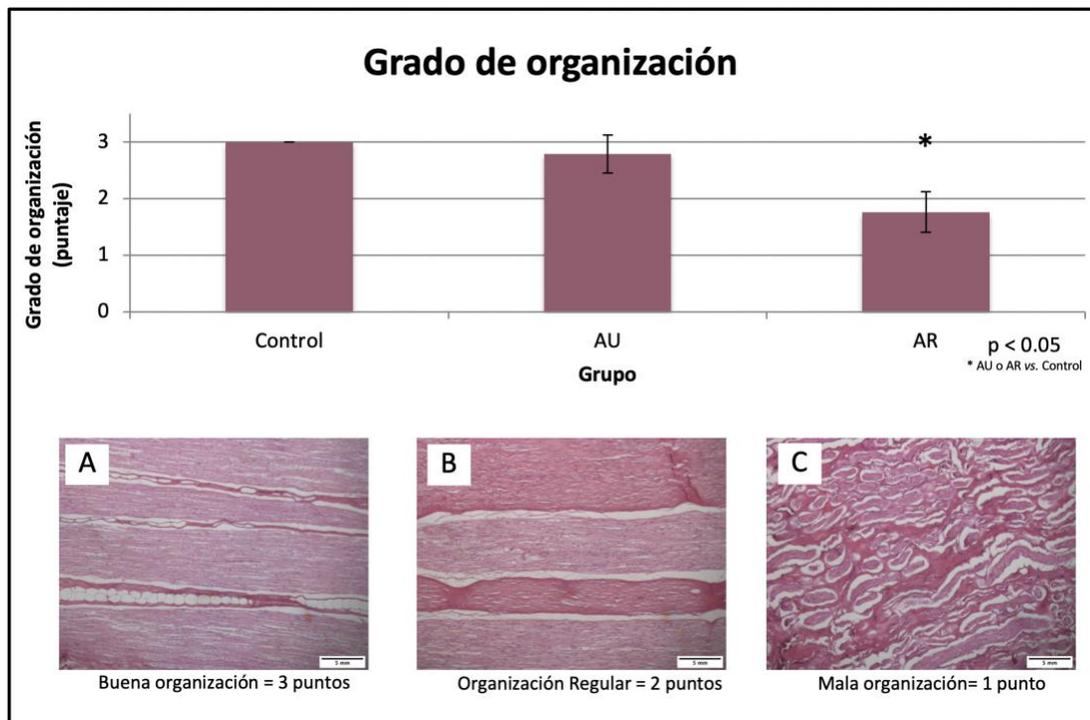
Doce meses PO (media ± DE)	Control/ Sham (n=14)	Autoinjerto (n=7)	Aloinjerto	
			Recelularizado (n=7)	Valor de P
Piel				
Latencia (ms)	1.54 (0.26)	1.61 (0.32)	1.48 (0.13)	NS
Amplitud (mV)	23.5 (2.89)	16.77 (5.31)	17.68 (6.36)	NS
Vel. Cond. (m/s)	99.28 (13.04)	97.71 (17.6)	99 (13.4)	NS
Directo en el nervio				
Latencia (ms)	1.4 (0.32)	2.02 (0.61) *	1.77 (0.44)	0.0156
Amplitud (mV)	19.1 (4.76)	14.08 (5.34)	15.57 (5.9)	NS
Vel. Cond. (m/s)	87.14 (16.79)	55.14 (19.74) *	68.28 (87.14)	0.0004

Los datos se presentan como media y DE según la unidad de medida. ANOVA. \*Diferencia estadísticamente significativa del grupo del autoinjerto en comparación con los controles. NS= No significativo. PO= postoperatorio, Vel. Cond. = Velocidad de conducción.

## 6.4. Análisis histológico

### 6.4.1. Morfología del nervio

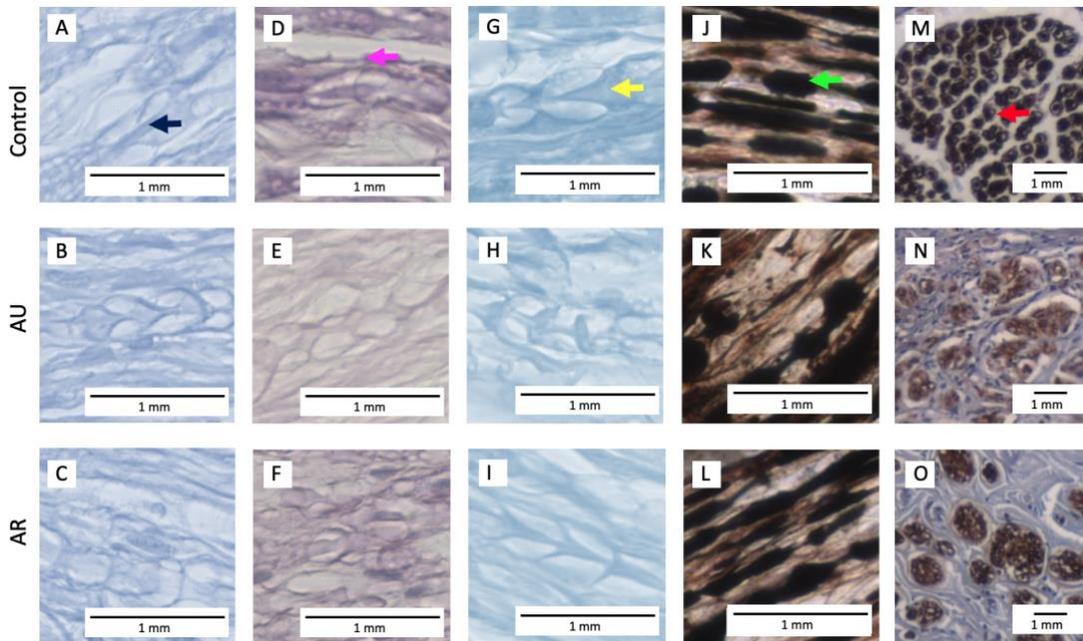
El análisis morfológico del NP reveló una menor organización de las fibras nerviosas en las porciones proximales y distales de ambos grupos tratados en comparación con los controles con la tinción H&E. Sin embargo, sólo el grupo de AR tuvo una puntuación más baja, siendo ésta estadísticamente significativa ( $p < 0.05$ ) (Fig. 23).



**Figura 23. Grado de organización de las fibras nerviosas.** Se evaluó con una escala, calificando: (A) 3 puntos = si se observaba una buena organización, (B) 2 puntos = si era

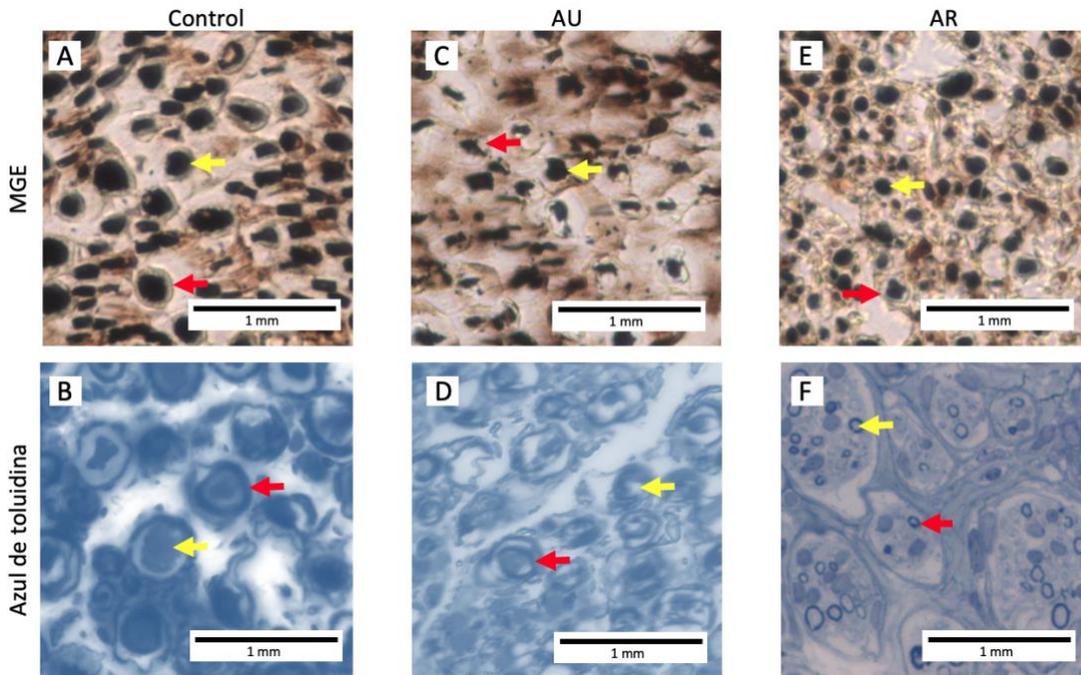
regular, y (C) 1 punto = si se evidenciaba una mala organización. Los datos se presentan como media y DE del promedio de las porciones proximales y distales del NP. Tinción H&E, corte longitudinal, aumento 100x. Análisis ANOVA. \*  $p < 0.05$  de diferencia entre los grupos de injertos en comparación con los controles.

Se observó una integridad en los elementos de la lámina externa: fibras de colágeno y polisacáridos complejos, en ambos grupos injertados en comparación con los controles (Fig. 24 A-F). Con respecto a la presencia de vainas de mielina y organización de axones, el grupo control no presentó ninguna alteración en la estructura del nervio periférico, siendo esto lo esperado: se observaron axones lineales con una matriz paralela de mielina (Fig. 24 G y J). En los grupos experimentales, el AU mostró una mejor organización en las vainas de mielina y en los axones en comparación con el el AR, siendo ésta caracterizada por la apariencia fina y ordenada de laminillas de mielina, axones delgados y gruesos con apariencia lineal. El AU mostró una disminución en los haces de axones y un aumento de tejido conectivo en el perineuro en comparación con el grupo de control, siendo éstos más gruesos que los observados en el AR; estos hallazgos se observaron con las técnicas KB y MGE (Fig. 24 G-L). La proteína S-100 fue inmunodetectada en la mielina en la región distal en los cortes axiales. Todos los grupos de estudio mostraron resultados positivos e, interesadamente, los injertos de nervio, también demostraron la presencia de esta proteína (Fig. 24 M-O).



**Figura 24. Análisis morfológico.** Se observa el NP con diversas tinciones (organizadas por columnas): TCM-M, (A, B y C); PAS (D, E y F); KB (G, H e I); MGE (J, K y L) en corte longitudinal con aumento 400x y la IHQ con S-100 (M, N y O) en corte axial con aumento 100x, de cada uno de los grupos. Se señala en el grup control: A) el colágeno (flecha azul), D) los polisacáridos (flecha magenta), G) la vaina de mielina (flecha amarilla), J) los axones (flecha verde), y M) axones positivos S-100 (flecha roja). Nótese esto mismo en ambos grupos con injertos (AU y AR).

La regeneración de los axones y de las vainas de mielina se analizó con la tinción la MGE y azul de toluidina (Fig. 25). En el grupo control, corroboramos los hallazgos observados con microscopía óptica: la integridad de los axones y la mielina. El AU mostró una morfología nerviosa similar a la del grupo de control; también se observaron varios haces de axones con un diámetro decreciente. En el grupo del AR, se identificaron numerosos haces de axones con un diámetro reducido, en comparación con el grupo de control, y separados por tejido conectivo.

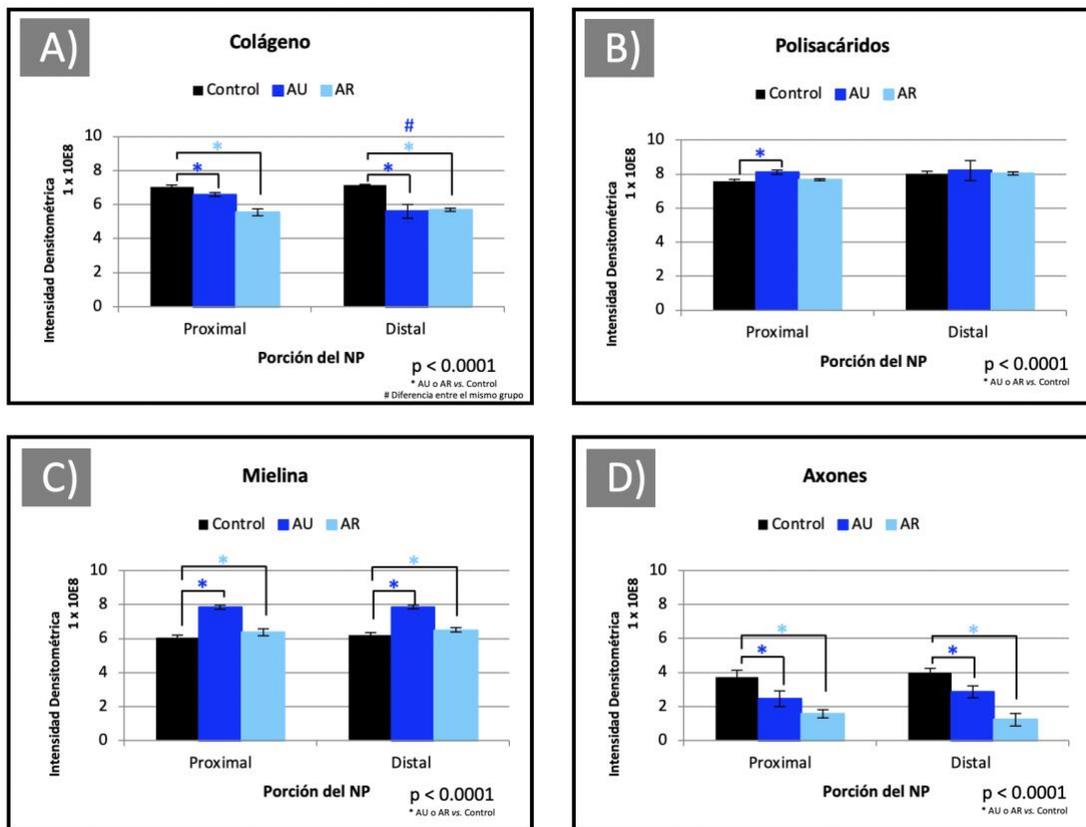


**Figura 25. Regeneración axonal morfológica.** Las tinciones (filas) de MGE y Azul de toluidina se realizaron en todos los grupos (columnas). Tinción MGE (A, C y E), tinción con azul de toluidina (B, D y F). Se identifican los axones (flechas amarillas), y las vainas de mielina (flechas rojas) en los cortes axiales del NP. Aumento 400x.

#### 6.4.2. Morfometría del nervio

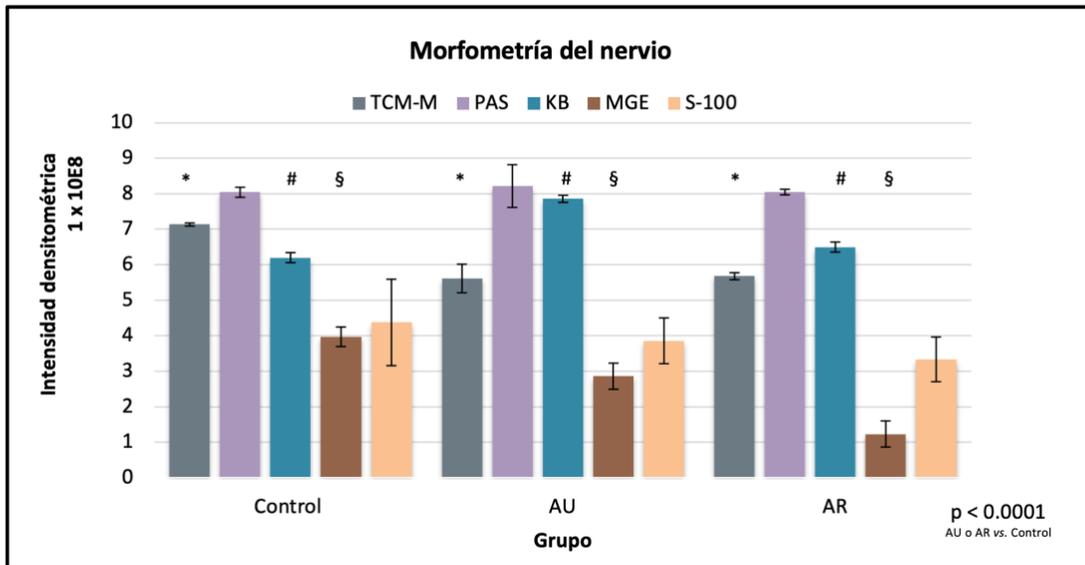
El análisis morfométrico (TCM-M, PAS, KB y MGE) reveló una menor intensidad del colágeno, siendo esto estadísticamente significativo ( $p < 0.0001$ ) en las regiones proximales y distales de ambos grupos tratados en comparación con los controles (Fig. 26 A). Además, se observó una intensidad considerablemente menor ( $p < 0.0001$ ) de impregnación argéntica (axones) en las áreas proximales y distales de ambos grupos tratados en comparación con los controles (Fig. 26 D). En el análisis de mielina, se

registró una mayor intensidad ( $p < 0.0001$ ) en las áreas proximales y distales de ambos grupos tratados (Fig. 26 C). No se observaron diferencias estadísticamente significativas en la intensidad de los polisacáridos de la lámina externa en la porción distal (Fig. 26 B); ni en los cortes axiales distales a la cuantificación positiva de S-100 (Fig. 27) en todos los grupos estudiados ( $p > 0.05$ ).



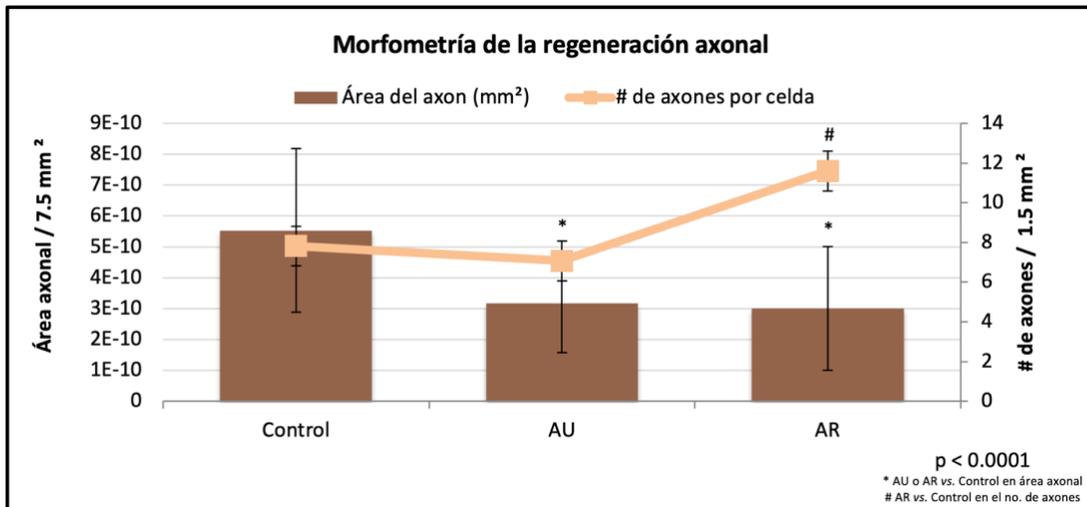
**Figura 26. Análisis morfométrico proximal y distal.** Se cuantificó la intensidad densitométrica para evaluar la integridad de la MEC con sus componentes de A) colágeno con la tinción TCM-M y B) polisacáridos con la tinción de PAS. La regeneración axonal se cuantificó mediante la respuesta a la intensidad de la C) mielina con la tinción de KB y de los D) axones con impregnación argéntica de MGE. Análisis ANOVA. \*  $p < 0.0001$  diferencia estadística entre los grupos injertados respecto a los controles. #  $p < 0.0001$  diferencia estadística entre la porción proximal y distal del mismo grupo.

El promedio de las porciones proximales y distales de las tinciones y de la IHQ se calculó y se graficó (Fig. 27).



**Figura 27. Análisis morfométrico promedio.** Se grafica la intensidad densitométrica de cada tinción o IHQ realizada. Los datos se presentan como media y DE. Análisis ANOVA. Cada símbolo indica una diferencia estadísticamente significativa ( $p < 0.0001$ ) entre los grupos con injertos en comparación con los controles, según su tinción histológica.

La regeneración de los axones se calculó cuantificando el área promedio del axón y por el número de axones por cuadrícula. Ambos injertos presentaron una disminución estadísticamente significativa ( $p < 0.0001$ ) en el área de los axones en comparación con los controles (AU:  $0.031 \pm 0.015$ ; AR:  $0.030 \pm 0.020$ ; C:  $0.055 \pm 0.026 \text{ mm}^2$ ). Sin embargo, sólo el AR tuvo un aumento estadísticamente significativo ( $p < 0.0001$ ) en el número de axones por cuadrícula en comparación con los controles (AU:  $7.07 \pm 1.6$ ; AR:  $11.6 \pm 4.93$ ; C:  $7.83 \pm 2.45$  axones) (Fig. 28).



**Figura 28. Morfometría de la regeneración axonal.** El lado izquierdo del gráfico muestra el área de los axones en 7.5 mm<sup>2</sup>; el lado derecho es el número de axones mielinizados en 1.5 mm<sup>2</sup>. Los datos se presentan como media y DE. Análisis ANOVA. \* p < 0.0001 diferencia estadística del área de los axones entre los grupos con injertos en comparación con los controles. # p < 0.0001 diferencia de axones entre el grupo de AR en comparación con los controles.

## CAPÍTULO VII

### 7. DISCUSIÓN

#### 7.1. Aoinjerto Recelularizado

La regeneración de los nervios periféricos después de una lesión sigue siendo un desafío en la cirugía reconstructiva.<sup>49</sup> Los aoinjertos son una opción terapéutica comparable con el estándar de oro actual.<sup>33</sup> Recientemente, el injerto de nervios *in vitro* con CMM-TA ha reportado resultados prometedores.<sup>50,51</sup> El objetivo del presente estudio fue comparar los resultados funcionales, la conducción nerviosa y la regeneración de los injertos nerviosos en ovinos con una LNP. Según el conocimiento de los autores, este estudio representa el primer ensayo preclínico que demuestra resultados superiores del uso de nervio descelularizado y recelularizado en modelos de tamaño mediano para seguimiento a largo plazo.

### 7.1.1. Caracterización de CMM-TA alogénicas y pre-diferenciación de CMM-TA a CtS

Se ha descrito el uso de ANA recelularizados con CMM diferenciadas o no en SC.<sup>22,27,52</sup> Las CMM se han considerado hipoinmunogénicas *in vitro* debido a su expresión limitada del CMH CMH I y a la falta de expresión del CMH II.<sup>25</sup> Las CS contribuyen al apoyo estructural y son una guía durante la regeneración axonal.<sup>53</sup> Se han implantado SC alogénicas en modelos de roedores, lo que ha mejorado la regeneración nerviosa, sin reacciones inmunes adversas.<sup>29,36,54</sup> Esto está relacionado con la estructura general del CMH que se conserva entre las especies de mamíferos; en rumiantes, los genes de clase I son parálogos, la región de clase II se divide en dos subregiones distintas y las regiones de clase III son ortólogos.<sup>30</sup> Lo que disminuye el riesgo de reacciones adversas relacionado con los aloinjertos de CMM.

Gersey *et al.*, informaron recientemente sobre la primera experiencia humana con CMM autólogas inducidas a CS en lesiones del nervio ciático. Dos pacientes tuvieron una mejoría significativa en la función motora y sensorial con imágenes correlativas a los 12 y 36 meses de seguimiento.<sup>27</sup> La diferenciación de CMM a CS requiere aproximadamente 30 días.<sup>27</sup> La trans-diferenciación de células podría reducir el tiempo de recolección de CS. Sharma *et al.* transdiferenciaron CMM derivadas de médula ósea a CtS en 13

días.<sup>55</sup> Nuestro equipo de investigación redujo el tiempo al realizar una preinducción de CMM a CtS cinco horas. Esto es importante debido a que se ha reportado que la recuperación funcional de la extremidad depende directamente del tiempo en el que se realice la reparación de una LNP.<sup>56</sup>

### **7.1.2. Aloinjerto nervioso acelular**

Se han descrito varias técnicas de descelularización nerviosa para asegurar la máxima eliminación de los componentes celulares.<sup>57</sup> En ensayos preclínicos, se han descrito técnicas que incluyen la descelularización con Triton X-100 a base de detergente no iónico, que consiste en lavados frecuentes por 15 días.<sup>58</sup> Sin embargo, la integridad de la lámina no se conserva en óptimas condiciones; por lo tanto, la combinación de sulfobetaína-10 (SB-10) y sulfobetaína-16 (SB-16) con Triton X-200 mejora la conservación de la MEC. Esta técnica ha servido para generar un ANP disponible comercialmente, el injerto nervioso Avance® (AxoGen, Inc.).<sup>4</sup> Nuestro método de descelularización fue una mejora a las técnicas descritas, siendo más rápido (5 días) e incluye la adición de condroitinasa ABC. Nuestros resultados coinciden con los de Neubauer *et al.*, en el que reportó que los injertos de condroitinasa ABC tuvieron una mejor reinervación en comparación con los injertos de nervio acelular sin condroitinasa ABC en ratas.<sup>59</sup>

## 7.2. Funcionalidad de la extremidad

Las ovejas se han empleado ampliamente como modelo para el estudio de la regeneración de nervios periféricos.<sup>31</sup> En nuestro modelo, las lesiones del nervio peroneo provocaron que las articulaciones del corvejón y el menudillo se sobre-flexionaran y se observó su recuperación gradual en el seguimiento anual en la extensión de la extremidad. Siendo esto corroborado con el análisis de la marcha, en el que se evidenció una recuperación significativa de la función de la extremidad trasera con el tiempo. Estos resultados fueron consistentes con un informe anterior, en el que se identificó la recuperación funcional completa después de la LNP al comparar los injertos de venas descelularizados rellenos con fibras de seda de araña *versus* autoinjertos de nervio tibial en ovinos.<sup>60</sup>

## 7.3. Conducción nerviosa

El análisis de conducción nerviosa demostró una regeneración nerviosa exitosa. La amplitud refleja el número de axones funcionales, mientras que la latencia y la velocidad de conducción están determinadas por el grado de mielinización.<sup>60,61</sup> Forden *et al.*, describieron resultados electrofisiológicos satisfactorios al comparar autoinjertos de nervio mediano

*versus* control en ovejas a los seis y nueve meses. La amplitud nerviosa y la velocidad de conducción disminuyeron en el grupo de autoinjerto sin diferencias significativas.<sup>62</sup> Radtke *et al.*, reportaron resultados similares al comparar injertos descelularizados y una transferencia nerviosa autóloga a los seis y diez meses.<sup>60</sup> Contrariamente a nuestros resultados, sólo el autoinjerto tuvo una disminución estadísticamente significativa en ambos valores. Esto puede indicar que el proceso de regeneración fue mejor en el AR que en el AU a los doce meses.

#### **7.4. Histología del nervio**

El análisis histomorfológico reveló una preservación estructural general, aunque se observó una disminución de la organización de las fibras nerviosas (Fig. 23). La integridad de la lámina externa (fibras de colágeno y polisacáridos complejos) se pudo identificar en ambos grupos de injertos en comparación con los controles (Fig. 24 A-F). Se demostró la regeneración de axones con un proceso de remielinización activo en ambos grupos de injertos en comparación con los controles (Fig. 24 G-L).

Los fascículos nerviosos se identificaron con la IHQ con S-100 en los cortes axiales semifinos, observándose vainas mixtas de mielina delgadas y gruesas y haces de axones con más tejido conectivo en el perineuro en el

AU. En el AR, se observaron fascículos nerviosos delgados, pero se identificaron varias vainas de mielina y haces de axones. En ambos injertos se observó un aumento en el tejido conectivo en las regiones distales y proximales en comparación con los controles (Fig. 24 M-O). Estos resultados son consistentes con informes anteriores que evaluaron la regeneración nerviosa. Forden *et al.*, compararon autoinjertos de nervios periféricos en extremidades anteriores de ovejas, informando una mayor cantidad de tejido conjuntivo extra fascicular; así como aproximadamente el doble de fascículos en el nervio injertado y ligeramente más pequeños en comparación con los nervios control.<sup>62</sup> Además, Casañas *et al.*, compararon los injertos de nervios sintéticos con o sin CMM en ovejas e informaron una mejora en las fibras nerviosas mielinizadas a favor de los injertos de CMM a los seis meses; reportaron fibras nerviosas mielinizadas en las regiones proximales y distales a la lesión con variación de diámetro en la zona distal.<sup>63</sup> García-Pérez *et al.*, demostraron remielinización exitosa del injerto descelularizado con CS alogénicas. Este grupo mostró una mayor remielinización mediante la cuantificación de la señal de la proteína basada en mielina en el extremo proximal del nervio ciático en ratas.<sup>36</sup>

## 7.5. Limitantes del Estudio

La literatura reporta ensayos experimentales en modelos animales grandes con defectos nerviosos de 50-70 mm;<sup>60,62,64</sup> reconocemos que nuestro defecto nervioso era menor, lo cual es una limitante. Sin embargo, ningún informe previo en modelos ovinos ha descrito el uso de CtS en ANA. Por lo tanto, un defecto nervioso que logre la regeneración axonal podría satisfacer los requisitos mínimos para futuros ensayos clínicos.

## **CAPÍTULO VIII**

### **8. CONCLUSIÓN**

El ANA recelularizado con CtS demostró ser un tratamiento exitoso para las lesiones nerviosas de nervio periférico. En términos de recuperación motora, el injerto recelularizado es tan efectivo como el autoinjerto. Ambos injertos tuvieron resultados funcionales y de conducción nerviosa similares en comparación con sus nervios contralaterales no tratados, por lo que se acepta nuestra hipótesis.

Morfológicamente, el AU presentó una disposición mejor organizada de fibras nerviosas en comparación con el AR. Morfométricamente, se evidenció un proceso de remielinización activo y satisfactorio, lo que confirmó la regeneración nerviosa en ambos grupos tratados en comparación con los controles. Este enfoque podría trasladarse en una terapia clínica para tratar las LNP. En los pacientes, se podrían realizar evaluaciones seriadas y una estrecha monitorización del seguimiento para identificar la recuperación gradual de la capacidad funcional y sensorial de la extremidad afectada.

## CAPÍTULO IX

### 9. ANEXOS

#### 9.1. Medios y soluciones para cultivo celular

##### 9.1.1 Solución salina amortiguada por fosfatos (PBS) 1X pH7.4

En 500 ml de agua destilada (dH<sub>2</sub>O), disolver:

Cloruro de Potasio (KCl).....	0.106 g
Fosfato de Potasio Monobásico (KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> )	0.102 g
Cloruro de Sodio (NaCl).....	4.090 g
Fosfato de Disódio (Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ).....	0.798 g

Se colocan las sales en un vaso de precipitado adecuado para el volumen de la solución a preparar, se añade el 80% del dH<sub>2</sub>O y se mezcla con ayuda de un agitador magnético hasta diluir las sales. Ajustar el pH a 7.4 con Ácido clorhídrico (HCl) 1M e Hidróxido de Sodio (NaOH) 10 M. Aforar la solución al volumen final requerido y filtrar a través de una unidad de filtración de 45 µm y/o esterilizar en

autoclave. Bajo técnica aséptica distribuir en alícuotas de 50 mL en tubos cónicos y almacenar a 4°C.

### **HCl 1M**

HCl concentrado..... 8.62 ml  
dH<sub>2</sub>O..... 91.00 ml

No agregar el dH<sub>2</sub>O al ácido. Mezclar en plancha agitadora por 5 min. Aforar a 100 ml con dH<sub>2</sub>O.

### **NaOH 10M**

NaOH..... 40 g  
dH<sub>2</sub>O..... 40 ml

Mezclar en plancha agitadora con una barra magnética hasta disolver el NaOH por completo. Aforar a 100ml.

## **9.1.2 PBS 1X Suplementado**

Suplementar el PBS 1X con Gentamicina y Penicilina-Streptomicina (Gibco<sup>®</sup>, Gran Island, NY, 14072) a 50 µg/ml y Fungizone<sup>®</sup> a 2.5 µg/ml (Gibco<sup>®</sup>).

PBS 1X pH 7.4 ..... 50 ml  
Gentamicina 10 mg/mL..... 250 µl

Penicilina-Streptomicina 10 mg/mL..... 250 µl  
Fungizone®, 250 µg/mL..... 50 µl

### 9.1.3 PBS 1X suplementado para cultivo celular

Suplementado con Gentamicina (Gibco®, Gran Island, NY, 14072) a 50 µg/ml  
y Fungizone® a 2.5 µg/ml (Gibco®).

PBS 1X pH 7.4 ..... 50 ml  
Gentamicina 10 mg/mL..... 250 µl  
Fungizone®, 250 µg/mL..... 50 µl

### 9.1.4 Colagenasa I al 0.2%

Suplementada con Gentamicina a 50 µg/l y Fungizone® a 2.5 µg/ml.

Colagenasa tipo I 285 U/mg (Gibco®)..... 0.04 g  
PBS 1X ..... 20 ml

Gentamicina 10 mg/mL..... 100 µl  
Fungizone<sup>®</sup>, 250 µg/mL..... 20 µl

Filtrar la solución a través de discos de 45µm antes de adicionar antibiótico y antimicótico. Proteger de la luz y almacenar a 4°C.

### 9.1.5 Medio completo

Se emplea el medio mínimo esencial MEM alpha (1X) + GlutaMAX<sup>TM</sup> -I (Gibco<sup>®</sup>) suplementado con SBF (Gibco<sup>®</sup>) al 10%, Gentamicina a 50µg/ml y Fungizone<sup>®</sup> a 2.5 µg/ml. Se almacena a 4°C.

Medio MEM alpha ..... 45 ml  
SBF..... 5 ml  
Gentamicina 10 mg/mL..... 250 µl  
Fungizone<sup>®</sup>, 250 µg/mL..... 50 µl

### **9.1.6 Azul tripano al 0.2%**

Se emplea el azul tripano para cuantificar la viabilidad celular. Azul tripano 0.4% (Sigma-Aldrich® St. Louis, MO 63103 EUA).

Azul tripano 0.4% ..... 0.5 g

PBS 1X ..... 1ml

## **9.2. Técnicas morfológicas para el NP**

### **9.2.1 Técnica histológica convencional**

#### ***I. Fijación***

Sumergir las muestras en glutaraldehído al 4% en buffer de cacodilatos por 24h a 4°C, al cabo de este período cambiar el fijador por PBS 1X pH 7.4. Enseguida, el tejido se colocó en un cassette de inclusión, se rotuló y se dejó en agua destilada.

### **Glutaraldehído 4%**

Glutaraldehído 25%..... 16 ml  
Buffer de cacodilatos..... 84 ml

### **Buffer de cacodilatos 0.1M pH 7.4**

#### Solución A

Cacodilato de Na..... 4.28 g  
Agua destilada..... 100 ml

#### Solución B

Ácido clorhídrico..... 0.5 ml  
Agua destilada..... 25 ml

#### Solución de trabajo

Solución A..... 100 ml  
Solución B ..... 5.4 ml

## ***II. Procesamiento***

Las muestras se lavaron y mediante un histoquinete se deshidrataron, aclararon y se preincluyeron en parafina, para ello:

- a) Deshidratar en alcoholes graduales, 1h en cada uno (70, 80, 96, 96, 100 y 100%)
- b) Transferir a una solución de alcohol-xilol (1:1) por 1h.

- c) Pasar a xilol al 100% por 1h (dos cambios).
- d) Por último, llevar a parafina líquida por 1h (tres cambios).

### ***III. Inclusión, microtomía y montaje***

Enseguida, los cassettes con las muestras de tejido se llevaron a la estación de inclusión y se sometieron al baño de calor; el tejido se colocó en un molde de inclusión, se puso encima la base del cassette y mediante el dispensador de parafina se rellenó el molde para hacer los bloques de tejido. Los bloques se llevaron a la cámara fría para alcanzar la consistencia necesaria de la parafina para su posterior corte en secciones muy finas mediante microtomo. Por último, los cortes histológicos se llevaron a un baño de flotación, para montarlos en laminillas previamente rotuladas y se dejaron secar en la estufa a 60°C por 30 min.

#### **9.2.2 Desparafinado e hidratación**

1. Sumergir las laminillas en xilol al 100% por 5 min.
2. Transferirlas a alcohol-xilol (1:1) por 5 min.
3. Llevar a alcoholes graduales, 2 min en cada uno (100, 100, 96, 96 y 80%).

4. Por último, colocar las laminillas en agua destilada por 2 min.
5. Realizar la técnica de tinción pertinente.

### **9.2.3. Deshidratación, aclaración y montaje**

Realizar diez inmersiones en:

- a) Dos cambios de alcohol al 96%
- b) Dos cambios de alcohol al 100%
- c) Alcohol-xilol (1:1)
- d) Xilol al 100%

Dejar secar las laminillas dentro de la campana de extracción de gases. Enseguida, tomar las laminillas por un extremo, y sumergir en xilol y eliminar el exceso para poner una gota de resina Entellan y colocar cuidadosamente un cubreobjetos.

## 9.2.4 Tinciones

### a) *Hematoxilina y Eosina*

Cortes: 4 µm

#### Protocolo:

1. Desparafinar e hidratar preparaciones (anexo 9.2.2).
2. Pasar las laminillas a hematoxilina por 2 min.
3. Lavar con agua corriente, enjuague lento.
4. Realizar una inmersión rápida en alcohol ácido (5 s).
5. Lavar con agua corriente, enjuague lento.
6. Realizar 2 inmersiones rápidas en agua amoniacal 1% (5 s).
7. Lavar con agua corriente, enjuague lento.
8. Enjuagar con agua destilada.
9. Realizar 6 inmersiones en Eosina.
10. Deshidratar, aclarar y montar (anexo 9.2.3).

#### Reactivos

##### **Hematoxilina de Gil**

Agua destilada ..... 730 ml  
Etilenglicol ..... 250 ml  
Hematoxilina anhidrida..... 2 g

Yodato de potasio ..... 0.2 g  
Sulfato de aluminio ..... 17.6 g  
Ácido acético glacial ..... 2 ml

La solución se prepara en el orden en que están listado los reactivos y se mezclan con ayuda de un agitador magnético a TA durante 1 h. Se filtra (papel filtro Whatman® 20-30 µM) la primera vez antes de usar.

### **Eosina**

Eosina amarillenta ..... 1 g  
Agua destilada ..... 20 ml  
Alcohol 96° ..... 80 ml

De esta solución concentrada, se toma una parte y se agrega en tres partes de alcohol 80°. Antes de usar, se agrega 0.5 ml de ácido acético glacial por cada 100 mL de colorante preparado, se agita.

### **Solución de Alcohol-Ácido**

Ácido clorhídrico concentrado.....1 ml  
Alcohol 70° ..... 99 ml

### **Solución de Agua Amoniacal**

NaH<sub>4</sub>OH..... 1 mL

Agua destilada..... 99 mL

Resultados:

Núcleos: azul violeta

Citoplasma y fibras de colágeno: rojo-rosado

***b) Tricrómico de Masson Modificado***

Cortes: 4 µm

Protocolo:

1. Desparafinar e hidratar preparaciones (anexo 9.2.2).
2. Usar como mordente el fijador de Bouin por 60 min a 60°C. Al cabo de este tiempo, dejar enfriar, lavar con agua corriente hasta que el color amarillo desaparezca y dar un enjuague final con agua destilada.
3. Pasar a la solución de Hematoxilina férrica de Weigert durante 15 min, enseguida lavar con agua corriente hasta que ésta deje de teñirse y dar un enjuague final con agua destilada.
4. Pasar los cortes a la solución de Ácidos Fosfomolibdico-Fosfotúngstico durante 10 min y enjuagar brevemente con agua destilada.
5. Colorear con la solución de Azul de Anilina durante 15 s y lavar con agua corriente hasta eliminar el exceso de colorante.
6. Pasar al Ácido Acético- acuoso por 2 min.

7. Deshidratar, aclarar y montar (anexo 9.2.3).

**c) *Ácido Peryódico de Schiff***

Cortes: 4 µm

Protocolo:

1. Desparafinar e hidratar preparaciones (anexo 9.2.2).
2. Sumergir los cortes en la solución del ácido peryódico por 5 min.  
Enjuagar en agua corriente.
3. Sumergir en el reactivo de Schiff por 25 min a 60°C y lavar con agua corriente. Revisar que tomen el color rosa pálido.
4. Diferenciar los cortes en baño sulfuroso (inmersión rápida). Enjuagar en agua corriente.
5. Contrastar con hematoxilina de Harris o de Gill por 2 min. Enjuagar en agua corriente.
6. Decolorar en alcohol ácido (inmersión rápida) y lavar con agua corriente.
2. Virar con agua amoniacal y lavar con agua corriente.
3. Deshidratar, aclarar y montar (anexo 9.2.3).

Reactivos:

**Solución del ácido peryódico al 0.5%.**

Agua destilada.....100 ml  
Ácido periódico..... 0.5 g

#### **Solución de baño sulfuroso**

Agua destilada..... 100 ml  
Ácido clorhídrico (HCl) 1N ..... 5 ml  
Metabisulfito sódico al 10%..... 6 ml

#### **Solución de metabisulfito al 10%**

Disolver 10 g del reactivo en 100 ml de agua destilada.

#### **Solución de ácido clorhídrico 1N**

Disolver 8.35 mL del ácido en 91.65 ml de agua destilada.

#### **Solución del reactivo de Schiff**

Reactivo comercial (Sigma-Aldrich®, 3050 Spruce Street, St. Louis, MO 63103 USA).

#### **Resultados:**

Núcleos: Violeta, negro

Polisacáridos simples (glucógeno), mucopolisacáridos neutros, mucoproteínas, lámina externa, glucolípidos: rosa a violeta-púrpura

#### **d) Klüver Barrera**

Cortes: 7 µm

#### Protocolo:

1. Desparafinar las preparaciones, llevándolas sólo hasta alcohol al 80% (anexo 9.2.2).
2. Pasar las laminillas a solución de azul luxol 0.1% y dejar toda la noche a TA o en estufa a 60° C durante 90 minutos.
3. Enjuagar en alcohol 96° para remover el exceso de colorante.
4. Lavar en agua destilada hasta que deje de teñirla.
5. \*Revisar al microscopio y revisar el grado de sobrecoloración.
6. Diferenciar enseguida por medio de una inmersión rápida en solución de carbonato de litio 0.05% (5-10 s).
8. Lavar con agua destilada.
9. Sumergir las laminillas en solución de Violeta de Cresilo 0.1%, 5 - 10 min.
10. Enjuagar y diferenciar con una inmersión rápida en 2 cambios de alcohol 96°.
11. Deshidratar, aclarar y montar, a partir de alcohol absoluto (anexo 9.2.3).

#### Reactivos:

### **Solución de Luxol Fast Blue al 0.1%**

Luxol F.B. (Merck o Sigma)..... 0.1 g  
Alcohol 96°.....100 ml

Disolver el colorante en el alcohol adicionar 0.5 ml de ácido acético al 10%, previamente preparado, por cada 100 ml de solución estable.

### **Solución de Violeta de Cresilo al 0.1 %**

Violeta de Cresilo q.p..... 0.1 g  
Agua destilada ..... 100 ml

Después de preparada se adicionan 10 gotas de ácido acético glacial o concentrado y la solución se filtra.

### **Solución de Carbonato de Litio al 0.05%**

Carbonato de Litio..... 0.05 g  
Agua destilada ..... 100 ml

### **Resultados:**

Mielina: azul intenso

Células nerviosas y gliales: rosa a violeta

**e) Marsland Glee Erickson**

Cortes: 10 µm

Protocolo:

1. Desparafinar e hidratar preparaciones (anexo 9.2.2).
2. Lavar en agua destilada 3 min, 2 cambios.
3. Realizar una inmersión en nitrato de plata por 45 min a 37°C.
4. Lavar en formalina al 10% por 15 s.
5. Colocar en nitrato de plata amoniacal por 90 s.
6. Lavar en formalina al 10% por 1 min.
7. Enjuagar con agua destilada 3 min, 2 cambios.
8. Fijar la reacción con tiosulfato de sodio al 5% durante 5 min.
9. Enjuagar con agua destilada por 3 min.
10. Deshidratar, aclarar y montar (anexo 9.2.3).

Reactivos:

**Solución de Nitrato de Plata (AgNO<sub>3</sub>)\* al 20%**

AgNO<sub>3</sub>..... 6 g

Agua destilada ..... 30 ml (\*proteger la solución de la luz)

**Solución de AgNO<sub>3</sub> amoniacal**

AgNO<sub>3</sub> al 20%..... 30 ml

Etanol Absoluto..... 20 ml

A la solución anterior se le adiciona hidróxido de amonio concentrado gota a gota, hasta que se forme un precipitado café. Éste se continúa adicionando hasta que el precipitado se disuelva y finalmente se agregan 5 gotas más.

### **Solución de Tiosulfato de Sodio al 5%**

Tiosulfato de Sodio..... 5 g

Agua destilada ..... 100 ml

### Resultados:

Axones: marrón, oscuro

### ***f) Tetraóxido de Osmio y Azul de toluidina***

Cortes: 30 – 50 mm de tejido

### Protocolo:

1. Se requiere tejido fijado en glutaraldehído al 4%.
2. Trabajar en campana de extracción de gases.
3. Cortar según la orientación de interés (axial o longitudinal).
4. Colocar en eppendorfs 0.6 ml y agregar buffer de cacodilatos 0.01M  
pH 7.4 hasta aforar por 20 min.
5. Agregar tetraóxido de Osmio al 2% por 12h y colocar en oscuridad.

6. Realizar 3 lavados con buffer de cacodilatos 0.01M pH 7.4, 5 min c/u.
7. Agregar Nitrato de Uranilo acuoso 1% por 30 min.
8. Realizar 3 lavados con buffer de cacodilatos 0.01M pH 7.4, 5 min c/u.
9. Lavar con acetona 30%, 50%, 70%, 90%, 5 min c/u.
10. Lavar 3 veces con acetona 100%, 5 min c/u.
11. Agregar acetona- epon 1:1 por 12 h.
12. Dejar evaporar en campana de extracción por 4h.
13. Agregar epon puro, reposar por 1h.
14. Realizar la inclusión, con el tejido en la orientación de interés y dejar polimerizar por 72h a 60°C.
15. Se retira del molde y se prepara para devastar la pieza.
16. Se corta en el ultramicrotomo a 350 nm.
17. Se colocan en laminillas 2 o 3 cortes.
18. Se tiñen con azul de toulidina y se dejan en plancha caliente por 1-3 min.
19. Se observa a microscopio para ver el grado de tinción.

Reactivos:

**Buffer de cacodilatos 0.1M pH 7.4**

Solución A

Cacodilato de Na..... 4.28 g

Agua destilada..... 100 ml

### Solución B

Ácido clorhídrico..... 0.5 ml  
Agua destilada..... 25 ml

### Solución de trabajo

Solución A..... 100 ml  
Solución B ..... 5.4 ml

### **Tetra óxido de osmio 2% en buffer de cacodilatos**

Buffer de cacodilatos pH 7.4 ..... 50 ml  
Tetraóxido de osmio ..... 1 g

La cápsula de tetraóxido de osmio se cubre con una gasa para asegurarnos de no tocarla con los dedos. Se lava con extrán y agua de la llave. Se enjuaga con agua destilada y luego con ultrapura. Se lava un frasco ámbar con las mismas especificaciones que para la cápsula de tetraóxido de osmio. Se introduce la cápsula al frasco, se tapa y se agita hasta que se quiebre la cápsula. Se agrega buffer de cacodilatos bajo una campana de extracción y se deja reposar tapado toda la noche a TA para que se disuelva.

### **Nitrato de Uranilo acuoso 1%**

Nitrato de uranilo ..... 1 g  
Agua destilada ..... 100 ml

### **Resina epóxica**

Resina ..... 23.8 ml (29 g)  
DDSA ..... 16 ml (16 g)  
NMA ..... 11.5 ml (14.3 g)  
DMO30..... 1 ml (1 g)

En el estudio se utilizó resina epóxica MEDIA

### **Azul de toluidina**

Borato de sodio (Borax) ..... 5 g  
Agua destilada ..... 100 ml

Se calienta hasta disolver completamente.

Azul de toluidina ..... 1g

Se agrega la solución de borato de sodio, se agita para disolver y se filtra.

### **Resultados:**

Vaina de mielina: marrón oscuro con tetraóxido de osmio; azul oscuro con azul de toluidina.

### 9.3 Inmunocitoquímica e Inmunohistoquímica

#### Protocolo:

#### a) Inmunocitoquímica

1. Colocar  $5 \times 10^4$  CMM-TA en 500  $\mu$ l en cada pozo (laminilla para cultivo celular) por 12 h.
2. Fijar con metanol acetona 1:1 por 20 min a 4° C.
3. Agregar PSB 1X y realizar dos lavados con 500  $\mu$ l en cada pozo en campana de flujo laminar.
4. Agregar TBST 1X por 3- 5 min a TA.
5. Colocar el bloqueo de peroxidasa [sistema de detección Mouse and Rabbit Specific HRP / DAB ab64264 Abcam® (Cambridge, Reino Unido)] por 10 min a TA y retirar.
6. Agregar TBST 1X por 3- 5 min a TA.
7. Colocar el bloqueo de proteína en cámara húmeda a 37° C por 30 min y retirar.
8. Agregar el Anticuerpo primario S-100 (1:750) [Abcam® (Cambridge, Reino Unido)] por toda la noche (200  $\mu$ l en cada pozo).
9. Lavar con TBST 1X por 5 min.
10. Agregar anticuerpo secundario a 3 de 4 pozos, en pozo restante, agregar sólo PBS 1X por 30 min a 37 °C y retirar.
11. Lavar con TBST 1X por 5 min.

12. Añadir estreptavidina HRP 5 gotas por pozo por 30 min a 37 °C y retirar.
13. Lavar con TBST 1X por 5 min.
14. Revelar con sustrato de cromógeno 50 µl por 10 min a TA.
15. Realizar tres lavados con dH<sub>2</sub>O.
16. Contrarrestar con Hematoxilina de Gill por 30 a 60 s.
17. Lavar en agua corriente.
18. Lavar con dH<sub>2</sub>O.
19. Deshidratar, aclarar y montar (anexo 9.1.3).

## **b) Inmunohistoquímica**

Cortes: 4 µm

1. Desparafinar e hidratar preparaciones (anexo 9.2.2).
2. Las laminillas deben ser silanizadas.
3. Lavar el tejido: Realizar 3 lavados con TBST 1X por 3min cada uno.
4. Para recuperar los antígenos: agregar TRS por 10 min a 60° C. Precalentar el TRS 20 min antes, sin laminillas, 10 min con laminillas y 10 min dejar enfriar.
5. Para el bloqueo de peroxidasa endógena [sistema de detección Mouse and Rabbit Specific HRP / DAB ab64264 Abcam® (Cambridge, Reino Unido)]: agregar una gota de peroxidasa 3% por 10 min y lavar en solución TBST por 3-5 min. Realizar 3 lavados.

6. Para el bloqueo de proteínas: agregar 1 gota de solución de bloqueo por 30 min y retirar.
7. Agregar el anticuerpo primario S-100 (1:2000) [Dako® (CarpinteriaCA, EE.UU.)] por toda la noche a 4° C. Lavar con TBST por 3-5 min.
8. Agregar el anticuerpo secundario por 30 min a TA y lavar en TBST por 3-5 min.
9. Agregar la enzima, 1 gota de solución de estreptavidina HRP por 30 min y lavar en TBST por 3-5 min.
10. Revelar con sustrato de cromógeno en proporción 20:1 por 7 - 10 min.
11. Para la contratinción del tejido, lavar con dH<sub>2</sub>O por 2 min, 3 veces. Contrastar con Hematoxilina de Gill por 2 min. Realizar enjuague lento con agua corriente y luego con dH<sub>2</sub>O.
12. Deshidratar, aclarar y montar (anexo 9.2.3).

Reactivos:

**Solución de TBS 10X**

NaCl ..... 102.66 g

Tris Base..... 14.45 g

Ajustar pH a 7.4, aforar a 1 l con dH<sub>2</sub>O y filtrar.

### **Solución de TBST 1X**

TBST 20X (Abcam®) ..... 50 ml

dH<sub>2</sub>O ..... 950 ml

Agua destilada..... 100 ml

Ácido clorhídrico (HCl) 1N ..... 5 ml

Metabisulfito sódico al 10%..... 6 ml

### **Silanizado de laminillas**

Hacer uso de instrumental de plástico

Poly-L-lysine (Sigma-Aldrich®) ..... 5 ml

dH<sub>2</sub>O ..... 45 ml

1. Mezclar los componentes y pasar a una jarra tipo coplin de polipropileno.
2. Sumergir las laminillas a tratar por 10 min.
3. Dejar secar a TA.

### **Resultados:**

Mielina: marrón claro

## 9.4 Registro de actividad en los ovinos

Para cada uno de los ovinos se llevó un registro de la actividad realizada, relacionada con las visitas de seguimiento (Figura 29).

UANL		OR17-00001		SERVICIO DE ORTOPEDIA Y TRAUMATOLOGIA				
BORREGO ID		RAZA	EDAD	PESO	GRUPO			
Características								
FECHA CIRUGÍA								
Neurofisiología Evaluación			3 MESES Fecha					
Pruebas cutáneas			LATENCIA	DURACIÓN	AMPLITUD	ÁREA	DISTANCIA	VC
			ms	ms	mV	mVms	Est-Est mm	m/s
DERECHA	Peroneo largo	POST-LESIÓN						
		PRE-LESIÓN						
DERECHA	Tibial Craneal	POST-LESIÓN						
		PRE-LESIÓN						
IZQUIERDA	Peroneo largo	POST-LESIÓN						
		PRE-LESIÓN						
IZQUIERDA	Tibial Craneal	POST-LESIÓN						
		PRE-LESIÓN						
Neurofisiología Evaluación			6 MESES Fecha					
Pruebas cutáneas			LATENCIA	DURACIÓN	AMPLITUD	ÁREA	DISTANCIA	VC
			ms	ms	mV	mVms	Est-Est mm	m/s
DERECHA	Peroneo largo	POST-LESIÓN						
		PRE-LESIÓN						
DERECHA	Tibial Craneal	POST-LESIÓN						
		PRE-LESIÓN						
IZQUIERDA	Peroneo largo	POST-LESIÓN						
		PRE-LESIÓN						
IZQUIERDA	Tibial Craneal	POST-LESIÓN						
		PRE-LESIÓN						
Observaciones								
Fotos Clínicas	<input type="checkbox"/> 0 meses	<input type="checkbox"/> 3 meses	<input type="checkbox"/> 6 meses	<input type="checkbox"/> 9 meses	<input type="checkbox"/> 12 meses			
Video de Movilidad	<input type="checkbox"/> 0 meses	<input type="checkbox"/> 3 meses	<input type="checkbox"/> 6 meses	<input type="checkbox"/> 9 meses	<input type="checkbox"/> 12 meses			

Figura 29. Registro de actividades de los ovinos. Se registraron las pruebas realizadas según el tiempo de evolución.

## CAPÍTULO X

### 10. REFERENCIAS

1. Noble J, Munro CA, Prasad VSSV, Midha R. Analysis of upper and lower extremity peripheral nerve injuries in a population of patients with multiple injuries. *J Trauma - Inj Infect Crit Care*. 1998;45(1):116-122. doi:10.1097/00005373-199807000-00025
2. Saadat S, Eslami V, Rahimi-Movaghar V. The incidence of peripheral nerve injury in trauma patients in Iran. *Ulus Travma ve Acil Cerrahi Derg*. 2011;17(6):539-544. doi:10.5505/tjtes.2011.75735
3. Castillo-Galván ML, Maximiliano Martínez-Ruiz F, De La Garza-Castro Ó, et al. *Study of Peripheral Nerve Injury in Trauma Patients*. Vol 150.; 2014.
4. Chato-Astrain J, Philips C, Campos F, et al. Detergent-based decellularized peripheral nerve allografts: An in vivo preclinical study in the rat sciatic nerve injury model. *J Tissue Eng Regen Med*. 2020;14(6):789-806. doi:10.1002/term.3043
5. Horteur C, Forli A, Corcella D, Pailhé R, Lateur G, Saragaglia D. Short- and long-term results of common peroneal nerve injuries treated by neurolysis, direct suture or nerve graft. *Eur J Orthop Surg Traumatol*. 2019;29(4):893-898. doi:10.1007/s00590-018-2354-0

6. Ruijs ACJ, Jaquet JB, Kalmijn S, Giele H, Hovius SER. Median and ulnar nerve injuries: A meta-analysis of predictors of motor and sensory recovery after modern microsurgical nerve repair. *Plast Reconstr Surg*. 2005;116(2):484-494. doi:10.1097/01.prs.0000172896.86594.07
7. Siemionow M, Brzezicki G. Chapter 8 Current Techniques and Concepts in Peripheral Nerve Repair. *Int Rev Neurobiol*. 2009;87(C):141-172. doi:10.1016/S0074-7742(09)87008-6
8. Zhang Y, Luo H, Zhang Z, et al. A nerve graft constructed with xenogeneic acellular nerve matrix and autologous adipose-derived mesenchymal stem cells. *Biomaterials*. 2010;31(20):5312-5324. doi:10.1016/j.biomaterials.2010.03.029
9. Kuffler DP, Foy C. Restoration of Neurological Function Following Peripheral Nerve Trauma. *Int J Mol Sci*. 2020;21(5):1808. doi:10.3390/ijms21051808
10. Alluin O, Wittmann C, Marqueste T, et al. Functional recovery after peripheral nerve injury and implantation of a collagen guide. *Biomaterials*. 2009;30(3):363-373. doi:10.1016/j.biomaterials.2008.09.043
11. Zhang PX, Han N, Kou YH, et al. Tissue engineering for the repair of peripheral nerve injury. *Neural Regen Res*. 2019;14(1):51-58. doi:10.4103/1673-5374.243701
12. Wei AL, Liu SQ, Tao HY, Peng H. Repairing peripheral nerve defects with tissue engineered artificial nerves in rats. *Chinese J Traumatol - English Ed*. 2008;11(1):28-33. doi:10.1016/S1008-1275(08)60006-1

13. Cecilia Fabres V. Técnicas del futuro: ingeniería de tejidos y uso de células madre en medicina reproductiva. *Rev Médica Clínica Las Condes*. 2010;21(3):488-493. doi:10.1016/s0716-8640(10)70562-9
14. Mackinnon SE, Doolabh VB, Novak CB, Trulock EP. Clinical outcome following nerve allograft transplantation. *Plast Reconstr Surg*. 2001;107(6):1419-1429. doi:10.1097/00006534-200105000-00016
15. Moore AM, MacEwan M, Santosa KB, et al. Acellular nerve allografts in peripheral nerve regeneration: A comparative study. *Muscle and Nerve*. 2011;44(2):221-234. doi:10.1002/mus.22033
16. Myckatyn TM, Mackinnon SE. A review of research endeavors to optimize peripheral nerve reconstruction. *Neurol Res*. 2004;26(2):124-138. doi:10.1179/016164104225013743
17. Hiles RW. Freeze dried irradiated nerve homograft. A preliminary report. *Hand*. 1972;4(1):79-84. doi:10.1016/0072-968X(72)90019-8
18. Johnson PC, Duhamel RC, Meezan E, Brendel K. Preparation of cell-free extracellular matrix from human peripheral nerve. *Muscle Nerve*. 1982;5(4):335-344. doi:10.1002/mus.880050410
19. Sondell M, Lundborg G, Kanje M. Regeneration of the rat sciatic nerve into allografts made acellular through chemical extraction. *Brain Res*. 1998;795(1-2):44-54. doi:10.1016/S0006-8993(98)00251-0
20. Wang X, Hu W, Cao Y, Yao J, Wu J, Gu X. Dog sciatic nerve regeneration across a 30-mm defect bridged by a chitosan/PGA artificial nerve graft. *Brain*. 2005;128(8):1897-1910. doi:10.1093/brain/awh517

21. Lovati AB, D'Arrigo D, Odella S, Tos P, Geuna S, Raimondo S. Nerve repair using decellularized nerve grafts in rat models. A review of the literature. *Front Cell Neurosci.* 2018;12. doi:10.3389/fncel.2018.00427
22. Jiang L, Zheng Y, Chen O, Chu T, Ding J, Yu Q. Nerve defect repair by differentiated adipose-derived stem cells and chondroitinase ABC-treated acellular nerves. *Int J Neurosci.* 2016;126(6):568-576. doi:10.3109/00207454.2015.1048547
23. Di Summa PG, Kingham PJ, Campisi CC, Raffoul W, Kalbermatten DF. Collagen (NeuraGen®) nerve conduits and stem cells for peripheral nerve gap repair. *Neurosci Lett.* 2014;572:26-31. doi:10.1016/j.neulet.2014.04.029
24. Dudakovic A, Camilleri E, Riester SM, et al. High-resolution molecular validation of self-renewal and spontaneous differentiation in clinical-grade adipose-tissue derived human mesenchymal stem cells. *J Cell Biochem.* 2014;115(10):1816-1828. doi:10.1002/jcb.24852
25. Gu LH, Zhang TT, Li Y, Yan HJ, Qi H, Li FR. Immunogenicity of allogeneic mesenchymal stem cells transplanted via different routes in diabetic rats. *Cell Mol Immunol.* 2015;12(4):444-455. doi:10.1038/cmi.2014.70
26. Taniuchi M, Clarkt HB, Johnson EM. *Induction of Nerve Growth Factor Receptor in Schwann Cells after Axotomy (Monoclonal Antibody/Nerve Regeneration/Neurotrophic/Neurotropic/Haptotaxis)*. Vol 83.; 1986.
27. Gersey ZC, Burks SS, Anderson KD, et al. First human experience with autologous Schwann cells to supplement sciatic nerve repair: Report of

- 2 cases with long-term follow-up. *Neurosurg Focus*. 2017;42(3).  
doi:10.3171/2016.12.FOCUS16474
28. Hermanns S, Wunderlich G, Rosenbaum C, Hanemann CO, Müller HW, Stichel CC. Lack of immune responses to immediate or delayed implanted allogeneic and xenogeneic Schwann cell suspensions. *Glia*. 1997;21(3):299-314. doi:10.1002/(SICI)1098-1136(199711)21:3<299::AID-GLIA5>3.0.CO;2-0
29. Mosahebi A, Fuller P, Wiberg M, Terenghi G. Effect of allogeneic schwann cell transplantation on peripheral nerve regeneration. *Exp Neurol*. 2002;173(2):213-223. doi:10.1006/exnr.2001.7846
30. Dukkupati VSR, Blair HT, Garrick DJ, Murray A. 'Ovar-MHC' — Ovine major histocompatibility complex: Role in genetic resistance to diseases. *N Z Vet J*. 2006;54(4):153-160.  
doi:10.1080/00480169.2006.36689
31. Diogo CC, Camassa JA, Pereira JE, et al. The use of sheep as a model for studying peripheral nerve regeneration following nerve injury: review of the literature. *Neurol Res*. 2017;39(10):926-939.  
doi:10.1080/01616412.2017.1331873
32. Safa B, Jain S, Desai MJ, et al. Peripheral nerve repair throughout the body with processed nerve allografts: Results from a large multicenter study. *Microsurgery*. 2020;40(5):527-537. doi:10.1002/micr.30574
33. Safa B, Shores JT, Ingari J V., et al. Recovery of Motor Function after Mixed and Motor Nerve Repair with Processed Nerve Allograft. *Plast Reconstr Surg - Glob Open*. 2019;7(3).

doi:10.1097/GOX.0000000000002163

34. Rinker B, Zoldos J, Weber R V., et al. Use of processed nerve allografts to repair nerve injuries greater than 25 mm in the hand. In: *Annals of Plastic Surgery*. Vol 78. Lippincott Williams and Wilkins; 2017:S292-S295. doi:10.1097/SAP.0000000000001037
35. Arreola Romero A. Células mesenquimales humanas diferenciadas in vitro a células de schwann. Published online 2011.
36. García-Pérez MM, Martínez-Rodríguez HG, López-Guerra GG, et al. A modified chemical protocol of decellularization of rat sciatic nerve and its recellularization with mesenchymal differentiated schwann-like cells: Morphological and functional assessments. *Histol Histopathol*. 2017;32(8):779-792. doi:10.14670/HH-11-844
37. López Guerra GG. Descelularización de nervio ciático de rata y su posterior recelularización in vitro con células de Schwann. Published online 2014.
38. Pedroza Montoya FE. Reparación de lesiones nerviosas por xenoinjertos acelulares humanos, recelularizados con células de Schwann en un modelo ovino. Published online 2017.
39. Manterola C, Otzen T. Bias in Clinical Research. *Int J Morphol*. 2015;33(3):1156-1164. doi:10.4067/S0717-95022015000300056
40. De Aluja AS. Animales de laboratorio y la norma oficial Mexicana (NOM-062-ZOO-1999). *Gac Med Mex*. 2002;138(3):295-298. Accessed July 3, 2021. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12096401/>
41. Wang D, Liu XL, Zhu JK, et al. Bridging small-gap peripheral nerve

- defects using acellular nerve allograft implanted with autologous bone marrow stromal cells in primates. *Brain Res.* 2008;1188(1):44-53.  
doi:10.1016/j.brainres.2007.09.098
42. US Patent for Method for decellularization of tissue grafts Patent (Patent # 9,572,911 issued February 21, 2017) - Justia Patents Search. Accessed October 15, 2020. <https://patents.justia.com/patent/9572911>
43. Gause TM, Sivak WN, Marra KG. The role of chondroitinase as an adjuvant to peripheral nerve repair. *Cells Tissues Organs.* 2014;200(1):59-68. doi:10.1159/000369449
44. Theory and Practice of Histological Techniques - 6th Edition. Accessed June 22, 2021. <https://www.elsevier.com/books/theory-and-practice-of-histological-techniques/bancroft/978-0-443-10279-0>
45. Klüver H, Barrera E. A method for the combined staining of cells and fibers in the nervous system. *J Neuropathol Exp Neurol.* 1953;12(4):400-403. doi:10.1097/00005072-195312040-00008
46. Marsland TA, Glees P, Erikson LB. Modification of the glee's silver impregnation for paraffin sections. *J Neuropathol Exp Neurol.* 1954;13(4):587-591. doi:10.1097/00005072-195410000-00005
47. Tohill M, Mantovani C, Wiberg M, Terenghi G. Rat bone marrow mesenchymal stem cells express glial markers and stimulate nerve regeneration. *Neurosci Lett.* 2004;362(3):200-203.  
doi:10.1016/j.neulet.2004.03.077
48. Pérez Parra JE, González Marín AP. Diseño de un instrumento para la evaluación de patrones básicos de movilidad para adultos con lesión

- de neurona motora superior - UAM 2002. *Rev Iberoam Fisioter y Kinesiol.* 2005;8(2):48-58. doi:10.1016/S1138-6045(05)72782-9
49. Pfister BJ, Gordon T, Loverde JR, Kochar AS, Mackinnon SE, Kacy Cullen D. Biomedical engineering strategies for peripheral nerve repair: Surgical applications, state of the art, and future challenges. *Crit Rev Biomed Eng.* 2011;39(2):81-124.  
doi:10.1615/CritRevBiomedEng.v39.i2.20
50. Rbia N, Bulstra LF, Lewallen EA, Hovius SER, van Wijnen AJ, Shin AY. Seeding decellularized nerve allografts with adipose-derived mesenchymal stromal cells: An in vitro analysis of the gene expression and growth factors produced. *J Plast Reconstr Aesthetic Surg.* 2019;72(8):1316-1325. doi:10.1016/j.bjps.2019.04.014
51. Mathot F, Rbia N, Bishop AT, Hovius SER, Van Wijnen AJ, Shin AY. Adhesion, distribution, and migration of differentiated and undifferentiated mesenchymal stem cells (MSCs) seeded on nerve allografts. *J Plast Reconstr Aesthetic Surg.* 2020;73(1):81-89.  
doi:10.1016/j.bjps.2019.05.030
52. Liu G, Cheng Y, Guo S, et al. Transplantation of adipose-derived stem cells for peripheral nerve repair. *Int J Mol Med.* 2011;28(4):565-572.  
doi:10.3892/ijmm.2011.725
53. Jung N, Park S, Choi Y, et al. Tonsil-derived mesenchymal stem cells differentiate into a schwann cell phenotype and promote peripheral nerve regeneration. *Int J Mol Sci.* 2016;17(11).  
doi:10.3390/ijms17111867

54. Hermanns S, Wunderlich G, Rosenbaum C, Hanemann CO, Müller HW, Stichel CC. Lack of immune responses to immediate or delayed implanted allogeneic and xenogeneic Schwann cell suspensions. *Glia*. 1997;21(3):299-314. doi:10.1002/(SICI)1098-1136(199711)21:3<299::AID-GLIA5>3.0.CO;2-0
55. Sharma AD, Wiederin J, Uz M, et al. Proteomic analysis of mesenchymal to Schwann cell transdifferentiation. *J Proteomics*. 2017;165:93-101. doi:10.1016/j.jprot.2017.06.011
56. Grinsell D, Keating CP. Peripheral Nerve Reconstruction after Injury: A Review of Clinical and Experimental Therapies. *Biomed Res Int*. 2014;2014. doi:10.1155/2014/698256
57. Buckenmeyer MJ, Meder TJ, Prest TA, Brown BN. Decellularization techniques and their applications for the repair and regeneration of the nervous system. *Methods*. 2020;171:41-61. doi:10.1016/j.ymeth.2019.07.023
58. Hu J, Zhu QT, Liu XL, Xu Y bin, Zhu JK. Repair of extended peripheral nerve lesions in rhesus monkeys using acellular allogenic nerve grafts implanted with autologous mesenchymal stem cells. *Exp Neurol*. 2007;204(2):658-666. doi:10.1016/j.expneurol.2006.11.018
59. Neubauer D, Graham JB, Muir D. Chondroitinase treatment increases the effective length of acellular nerve grafts. *Exp Neurol*. 2007;207(1):163-170. doi:10.1016/j.expneurol.2007.06.006
60. Radtke C, Allmeling C, Waldmann KH, et al. Spider silk constructs enhance axonal regeneration and remyelination in long nerve defects in

- sheep. *PLoS One*. 2011;6(2). doi:10.1371/journal.pone.0016990
61. Lütchg J, Ludin HP. Electromyographic findings in patients after recovery from peripheral nerve lesions and poliomyelitis. *J Neurol*. 1981;225(1):25-32. doi:10.1007/BF00313458
62. Forden J, Xu QG, Khu KJ, Midha R. A long peripheral nerve autograft model in the sheep forelimb. *Neurosurgery*. 2011;68(5):1354-1362. doi:10.1227/NEU.0b013e31820c08de
63. Casañas J, De La Torre J, Soler F, et al. Peripheral nerve regeneration after experimental section in ovine radial and tibial nerves using synthetic nerve grafts, including expanded bone marrow mesenchymal cells: Morphological and neurophysiological results. *Injury*. 2014;45(S4):S2-S6. doi:10.1016/S0020-1383(14)70003-8
64. Matsuyama T, Midha R, Mackinnon SE, Munro CA, Wong PY, Ang LC. Long nerve allografts in sheep with cyclosporin A immunosuppression. *J Reconstr Microsurg*. 2000;16(3):219-225. doi:10.1055/s-2000-7556

## **CAPÍTULO XI**

### **11. RESUMEN AUTOBIOGRÁFICO**

Dra. Yadira Alejandra Tamez Mata

Candidato para el Grado de

Doctor en Medicina

**Tesis: USO DE INJERTO DE NERVIOS ACELULARES  
RECELULARIZADOS CON CÉLULAS TIPO SCWHANN:  
ENSAYO PRE-CLÍNICO**

Campo de Estudio: Ingeniería de Tejidos

#### **Biografía:**

Datos Personales: Nacida en Monterrey, Nuevo León, el 7 de septiembre de 1989, hija del Lic. Víctor Alejandro Tamez Morales y de la Lic. María Delfina Mata Barbosa.

Educación: Egresada de la Universidad Autónoma de Nuevo León, grado obtenido Médico Cirujano Partero de la generación en el 2014 con mención honorífica, tercer lugar de generación. Servicio Social en Investigación en Salud del 2014 al 2015.

Experiencia Profesional: Coordinador de Calidad del Servicio de Ortopedia y Traumatología desde el 2017, asistente de investigación en el mismo servicio desde el 2014. Profesor auxiliar de la Asignatura de Calidad en la Atención en Salud desde el 2018.

Organizaciones a las que pertenece: Miembro activo de la Asociación Médica de San Nicolás y área Metropolitana A.C. y del Colegio de Médicos Cirujanos del Estado de Nuevo León desde el 2018.