



# UNIVERSIDAD DE GUADALAJARA

---

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

Evaluación histológica e inmunológica de la aplicación  
de una prótesis bioactiva de quitosana y esteroides en la  
regeneración del nervio ciático del perro

## **TESIS**

que para obtener el grado de  
**DOCTOR EN CIENCIAS DEL COMPORTAMIENTO**  
(opción Neurociencias)

presenta

**Manuel Rosales Cortés**

Comité Tutorial

**Dr. Jacinto Bañuelos Pineda (Director)**

Dra. Galina P. Zaitseva

Dr. Jorge Juárez González

Dra. Marisela Hernández González

Asesor

Mtro. Daniel Zarabozo E. de R.

Guadalajara, Jalisco

Diciembre de 2002

El trabajo se realizó con financiamiento del proyecto apoyado por CONACYT con el número de referencia 30437-M y los fondos recurrentes proporcionados por la Universidad de Guadalajara y fue desarrollado en los laboratorios de:

- ✂ Laboratorio de Neuromorfología, a cargo del Dr. en C. Jacinto Bañuelos Pineda. Del Centro Universitario de Ciencias Biológicas y Agropecuarias de la Universidad de Guadalajara, México.
- ✂ Laboratorio de Inmunología del Departamento de Biología Celular y Molecular a cargo de la Dra. en C. Galina P. Zaitseva. Del Centro Universitario de Ciencias Biológicas y Agropecuarias de la Universidad de Guadalajara, México.
- ✂ Laboratorio de Microscopía Electrónica e Inmunocitoquímica a cargo del M. en C. Ulises Gómez Pineda. Del Centro de Investigación y Asistencia y Tecnología y Diseño del estado de Jalisco, México.
- ✂ Laboratorio de Polímeros, a cargo del Dr. en C. Fernando López Dellamary. Del Instituto de Madera y Celulosa y Papel. Del Centro Universitario de Ciencias Biológicas y Agropecuarias de la Universidad de Guadalajara, México.

Investigador responsable: **Manuel Rosales Cortés del proyecto CONACYT. Titulado: Evaluación de la respuesta inmunológica de una prótesis bioactiva de quitosana y neuroesteroides aplicada en la regeneración del nervio ciático axotomizado del perro. con el Número de referencia 30437-M.**

Dirección laboral: Laboratorio de Neuromorfología del departamento de Medicina Veterinaria de la división de Ciencias Veterinarias del Centro Universitario de Ciencias Biológicas y Agropecuarias de la Universidad de Guadalajara, México.

Carretera Nogales Kilómetro 15.5 predio las Agujas Nextipac zapopan Jalisco México.

Teléfono y fax (01-33) 36-82-09-18.

Correo electrónico: **mrosales@cucba.udg.mx**

Dedicada a mi esposa Genoveva Navarro y a mis hijos: Jorge A., Esaú M. y Paloma Ximena quienes fueron un gran estímulo durante todo este tiempo para salir adelante con este trabajo que significo para mi un reto y una gran responsabilidad.

A mis padres: Natalia Cortés y Guadalupe Rosales que siempre están conmigo en las buenas y en las malas.

A mis hermanos, sobrinos y cuñados que ni se imaginan el esfuerzo y el trabajo que significa todo este embrollo pero que me apoyan.

A los doctores: Jacinto Bañuelos, Esther Albarrán, Jorge Juárez, Marisela Hernández y Galina Zaitseva quienes en todo momento estuvieron guiando con sus conocimientos y experiencia el desarrollo del trabajo.

A la Universidad de Guadalajara y al Sistema Nacional de Ciencia y Tecnología que al financiar este proyecto me brindaron la oportunidad de superarme profesionalmente y personalmente.

A mis compañeros de laboratorio: Rachel, Eduardo, Elfrego y Memo quienes soportaron mi tacto, sutileza, delicadeza y sabiduría para dirigir el presente trabajo.

A mis amigos y hermanos Jorge Peregrina Sandoval y Ulises Gómez Pinedo quienes con sus amplios conocimientos me ayudaron a sacar adelante este trabajo.

Gracias a dios porque siempre que me meto en estos problemas me ayuda a salir adelante y si él quiere voy a estar mucho tiempo con ustedes.

En fin gracias a todos y cada uno de ellos.....

## Resumen.

El biomaterial quitosana es un poli-1-4-2-D-glucosamina resultante de la desacetilación de quitina. En la última década se le ha dado un gran uso en diferentes aplicaciones del área biomédica con buenos resultados para reparar tejido óseo, conectivo, epitelios de revestimiento, como vehículo de liberación prolongada, cicatrizante de la piel y para la elaboración de tratamientos dérmicos en quemaduras. Así mismo, recientemente se ha utilizado en varios trabajos experimentales para la fabricación de prótesis a las que se les adicionó esteroides en sus paredes y se utilizaron en la técnica de tubulización para inducir con éxito la regeneración de nervios periféricos seccionados de conejo y rata.

Sin embargo, hasta el momento no se ha reportado si este biomaterial altera y / o deprime la respuesta celular y humoral del organismo. Con base en lo anterior el objetivo del presente estudio fue determinar si la presencia de la quitosana altera la respuesta inmune del organismo al ser implantada. Se utilizaron 20 hembras caninas adultas jóvenes; 16 ovarioesterioctomizadas previamente; 4 tubulizadas con prótesis de quitosana sin esteroides; 4 con quitosana y el esteroide progesterona; 4 con quitosana y pregnenolona; 4 axotomizadas sin tubulizar; y 4 sin lesionar como grupo control. Se realizaron antes y después de la axotomía-tubulización pruebas de cultivo in vitro de linfocitos, de fagocitosis, para valorar la respuesta celular y se cuantificaron las IgG e IgM para la respuesta humoral, también se analizó el nervio regenerado con microscopía de luz y electrónica de transmisión.

Resultados: las hembras no mostraron rechazo local de las prótesis y estas fueron biodegradadas y bioabsorbidas en un plazo de 60 días. La liberación de los neuroesteroides fue gradual y constante por lo que se aseguró un tratamiento local in situ. Las prótesis de quitosana con o sin esteroides no fueron inmunodepresoras ni inmunoestimulantes de la respuesta inmune celular o humoral. Esto se evidenció mediante las pruebas inmunológicas realizadas las cuales demostraron que no hubo diferencias significativas entre tratamientos ni entre grupos a través del tiempo con respecto al grupo control que no fue axotomizado, se logró la regeneración del nervio en las hembras axotomizadas y tubulizadas. Conclusiones: independientemente del tratamiento el análisis morfométrico del segmento regenerado indicó la presencia de axones mielinizados y no mielinizados a los 60 días poslesión. Los animales con prótesis de quitosana y el esteroide pregnenolona presentaron una mejor organización del nervio; axones con mayor diámetro y número de fibras mielinizadas y no mielinizadas.

Las hembras axotomizadas que no fueron tubulizadas licuefactaron por completo los vestigios de los muñones distales y proximales que quedaron al momento de la axotomía y no pudieron recuperar las funciones motoras y sensitivas de la pierna lesionada.

**Abreviaturas.**

<b>ANDEVA</b>	Análisis de varianza
<b>BDNF</b>	Factores de crecimiento derivados del cerebro
<b>BFGF</b>	Factor básico de crecimiento de fibroblastos
<b>CNPasa</b>	Nucleótido 2'3-cíclico 3-fosfodiesterasa
<b>DAB</b>	3'3 Diaminobencidina
<b>FB</b>	Fibroblasto
<b>FNT</b>	Factor neurotrófico
<b>FPN</b>	Factor promotor de neuritas
<b>GABA<sub>A</sub></b>	Ácido gama amino-butírico
<b>GAP-43</b>	Proteína de crecimiento axónico 43
<b>IGF-1</b>	Factor de crecimiento semejante a la Insulina tipo 1
<b>IL-1</b>	Interleucina 1
<b>LMN</b>	Laminina
<b>MBP</b>	Proteína básica de mielina
<b>mRNA</b>	Ácido ribonucleico mensajero
<b>NGF</b>	Factor de crecimiento neural
<b>PMN</b>	Polimorfonucleares
<b>SNC</b>	Sistema nervioso central
<b>SNP</b>	Sistema nervioso periférico
<b>CCP</b>	Cono de crecimiento proximal
<b>CCD</b>	Cono de crecimiento distal
<b>MP</b>	Muñón proximal
<b>MD</b>	Muñón distal
<b>P0</b>	Proteína cero
<b>MAG</b>	Glucoproteína asociada a la proteína
<b>PM22</b>	Proteína periférica-22

## **CONTENIDO**

<b>Resumen.....</b>	<b>I</b>
<b>Abreviaturas.....</b>	<b>II</b>
<b>INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>1</b>
<b>Sistema nervioso .....</b>	<b>2</b>
<b>Ultraestructura de un nervio periférico.....</b>	<b>2</b>
<b>Origen y distribución del nervio ciático del perro.....</b>	<b>8</b>
<b>Degeneración nerviosa tras lesión.....</b>	<b>9</b>
<b>Cambios ultraestructurales que se presentan en un nervio periférico lesionado.....</b>	<b>10</b>
<b>Regeneración de nervios periféricos.....</b>	<b>11</b>
<b>Eventos celulares de la regeneración nerviosa de un nervio periférico.....</b>	<b>12</b>
<b>Participación de los neuroesteroides en la regeneración nerviosa.....</b>	<b>14</b>
<b>Antecedentes históricos y características de las cámaras axónicas y de los materiales orgánicos e inorgánicos que se han utilizados para fabricarlas..</b>	<b>15</b>
<b>Tubulización y regeneración de nervios periféricos seccionados.....</b>	<b>17</b>
<b>Ventajas de la utilización del biomaterial quitosana en la reparación nerviosa.....</b>	<b>18</b>
<b>Algunas propiedades inmunológicas y aplicaciones de la quitosana en el área biomédica.....</b>	<b>20</b>
<b>Ontogenia del sistema inmunológico del perro.....</b>	<b>21</b>
<b>Principios de la inmunodifusión radial para la determinación de inmunoglobulinas .....</b>	<b>23</b>
<b>Respuesta inmune humoral.....</b>	<b>23</b>
<b>Fagocitosis.....</b>	<b>24</b>
<b>Respuesta inmune celular.....</b>	<b>26</b>
<b>Comportamiento de la respuesta inmune por la presencia de biomateriales en el organismo.....</b>	<b>27</b>
<b>Respuesta inflamatoria local ante la presencia de biomateriales.....</b>	<b>28</b>
<b>PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....</b>	<b>29</b>

<b>HIPÓTESIS.....</b>	<b>31</b>
<b>OBJETIVO GENERAL.....</b>	<b>32</b>
<b>OBJETIVOS PARTICULARES.....</b>	<b>32</b>
<b>MATERIALES Y MÉTODOS.....</b>	<b>33</b>
<b>Condiciones experimentales.....</b>	<b>34</b>
<b>Diagrama de flujo que representa el diseño experimental.....</b>	<b>35</b>
<b>Preparación de las prótesis de quitosana.....</b>	<b>37</b>
<b>Axotomía-tubulización.....</b>	<b>38</b>
<b>Preparación de tejidos para análisis estructural.....</b>	<b>40</b>
<b>Blastotransformación linfoide (cultivo in vitro de linfocitos) para evaluar la     respuesta celular.....</b>	<b>41</b>
<b>Prueba de fagocitosis con el método de adherencia al vidrio de     Cunningham.....</b>	<b>42</b>
<b>Técnica de radioinmunodifusión para la determinación cuantitativa de     inmunoglobulinas caninas.....</b>	<b>44</b>
<b>RESULTADOS.....</b>	<b>45</b>
<b>Análisis macroscópico de la regeneración del nervio ciático.....</b>	<b>46</b>
<b>Análisis con microscopia de luz del nervio en regeneración.....</b>	<b>51</b>
<b>Análisis estructural del segmento regenerado mediante microscopia     electrónica de transmisión.....</b>	<b>53</b>
<b>Análisis morfométrico del segmento nervio regenerado.....</b>	<b>56</b>
<b>Resultados de la respuesta inmune por la presencia de las prótesis     implantadas.....</b>	<b>60</b>
<b>DISCUSIÓN.....</b>	<b>68</b>
<b>CONCLUSIONES.....</b>	<b>76</b>
<b>BIBLIOGRAFÍA.....</b>	<b>77</b>

## **INTRODUCCIÓN.**

La regeneración de los nervios periféricos en los que se ha perdido un segmento extenso del mismo, implica una compleja interacción de células y sustancias que tienen como objetivo promover la regeneración del nervio con la intención de restaurar las funciones motoras y sensitivas del área denervada. Sin embargo, a pesar de los esfuerzos que se realizan para lograrlo, los resultados que se han obtenido con el uso de las técnicas tradicionales en la reparación de nervios periféricos han sido poco favorables. En los últimos años se han estudiado diversos compuestos de origen orgánico, como el surgicel, milipore, fibras de colágena y, recientemente, el biomaterial "quitosana" que es un homopolímero de estructura lineal presente en el caparazón de algunos invertebrados, plantas y hongos (Spector y col.,1991ab, 1992, 1993; Terris y col.,1993; Campbell y col.,1961; 1966; Braun y col.,1966; Kumar y col., 1999; Yoshii y col., 2001). Este material tiene la propiedad de incorporar a su estructura diversas sustancias que han demostrado que tienen capacidad mitogénica y neurotrófica. Entre estas sustancias se encuentran los neuroesteroides, llamados así porque se producen en tejido nervioso, independientemente de las glándulas esteroideas periféricas, y que en condiciones normales actúan como neuromoduladores de los neurotransmisores. También se ha demostrado que ayudan en la supervivencia de neuronas, inhiben la glíosis reactiva y estimulan la síntesis de mielina por parte de las células de Schwann (Weiss, 1944; Williams y col., 1987; Varón, 1993; García-Estrada, 1993).

Durante mucho tiempo el perro ha sido un modelo muy importante para la investigación en muchas áreas, ya que ha jugado un papel muy importante en la investigación de diferentes drogas. En él se han realizando diferentes pruebas de toxicidad, además de determinar sus efectos inmunosupresores en el organismo.

Históricamente, el perro ha sido un modelo ejemplar para ensayar los trasplantes de médula ósea y los avances que se han logrado se han transferido a las técnicas que se usan en la clínica humana. Recientemente, el perro es el modelo de elección para estudiar diferentes enfermedades que provocan inmunodeficiencia en el organismo, además de ensayar en él los diferentes trasplantes de órganos (Tizard, 1996).

## **Sistema nervioso.**

El sistema nervioso (SN) de los mamíferos, anatómicamente, está dividido en sistema nervioso central y periférico. Estructuralmente el sistema nervioso central (SCN) está compuesto de neuronas, astrocitos, oligodendrocitos, células de microglía, endoteliales, fibroblastos endoneurales (López-Antunez, 1990; Sisson y col., 1982). Las neuronas se especializan en la integración y transmisión de impulsos, los astrocitos regulan el espacio extracelular, la microglía tiene actividad fagocítica, como los macrófagos tisulares; y los oligodendrocitos sintetizan mielina.

En las neuronas se distinguen dendritas que se extienden desde el soma y se arborizan del cuerpo celular, también se extiende un axón único, este se divide en ramas terminales y es donde se almacenan los neurotransmisores secretados por el proceso axónico. El sistema nervioso periférico está conformado por la cadena ganglionar simpática, doce nervios craneales, nervios espinales que nacen en la medula espinal y que emergen por los agujeros intervertebrales, nervios periféricos que se originan en los plexos braquial y lumbosacro y ganglios nerviosos mesentéricos (López-Antunez, 1990; Sisson y col., 1982).

## **Ultraestructura de un nervio periférico.**

Un nervio periférico está formado por un gran número de fibras nerviosas que forman fascículos de distintos tamaños, estos a su vez están rodeados por tejido conectivo el cual se presenta de la siguiente manera; de afuera a hacia adentro se reconoce el epineuro, que es una estructura que rodea a los diferentes fascículos, perineuro; que es el que envuelve a los grupos de axones, y el endoneuro; que se encarga de envolver de forma individual a cada axón

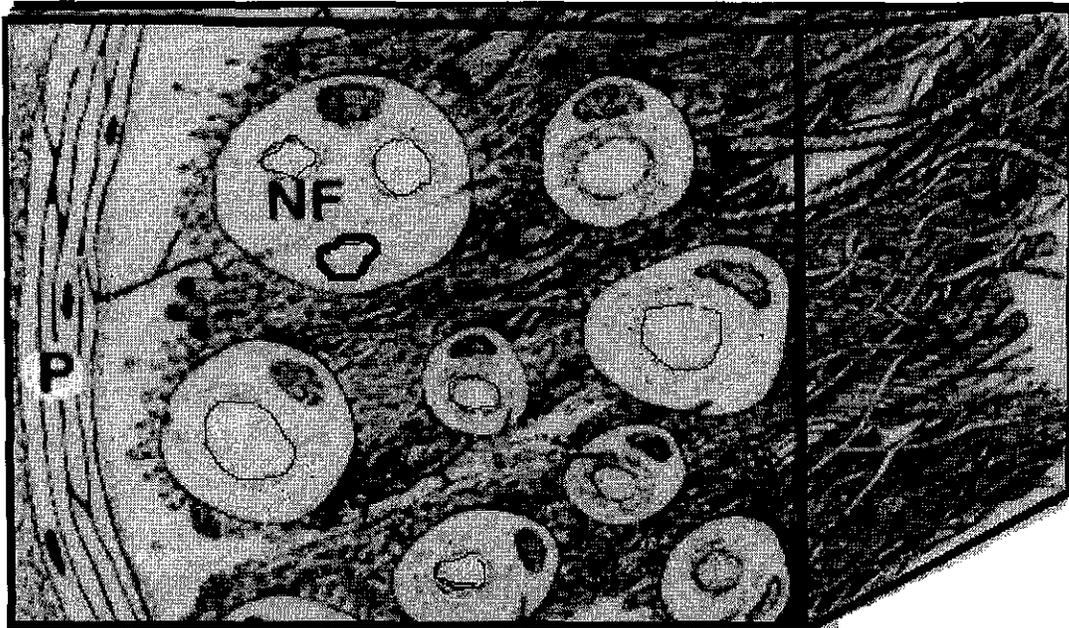
El epineuro rodea a uno o a varios fascículos, forma largos y fuertes cilindros ejes gracias a que contiene una gran cantidad de fibras de colágena y, además, está enriquecido por numerosos vasos sanguíneos. Su cara interna tiene contacto directo con el perineuro, en el también se han podido observar fibroblastos, células mast y fibras elásticas.

Existen diferencias estructurales y funcionales en el epineuro y perineuro, por ejemplo; se encuentran vasos linfáticos que sirven para drenar el tejido epineural; y por otro lado el perineuro es el único que cuenta con una barrera que es altamente selectiva en su permeabilidad protegiendo de esta manera el espacio endoneural (Spector y col., 1993; Dumitru, 1994).

También se sabe que el perineuro se forma a partir de los fibroblastos y no de forma directa de las células de Schwann; estructuralmente está formado por tejido conectivo con vesículas endocíticas que poseen en su interior células que se encuentran cerca de la superficie entre las fibras de colágena (figura 1).

El endoneuro en los humanos esta formado por células de Schwann, axones, células endoteliales vasculares, pericitos, fibroblastos y células cebadas de origen mesodérmico (figura 2) (Spector y col., 1993; Dumitru., 1994).

Los axones se originan del soma neuronal y están conformados por el axoplasma y dentro de él encontramos microtúbulos, mitocondrias, neurotúbulos, retículo endoplásmico rugoso y liso. Estas estructuras son envueltas por membranas plasmáticas enrolladas en espiral que terminan con dos caras; la externa; que forma el mesoaxón externo; y la cara interna; que es el mesoaxón interno. Los axones pueden estar envueltos o no con vainas de mielina formadas por lípidos (lípidos neutros, esfingolípidos y fosfoglicéridos) en una proporción de 70- 80 %; principalmente producidos por las células de Schwann, y un 20-30 % de proteínas; formados principalmente por MAG (glucoproteína asociada a la proteína), PM22 (proteína periférica-22) PO (proteína cero) Periaxinas y Caderina-E (Garbay y col., 2000). Para formar estas vainas, las células de Schwann aplastan su citoplasma sobre los axones envolviéndolos una capa sobre otra dejando espacios sin mielina conocidos como nodos de ranvier (figura 3) ( Ganon y col., 1997)



**Figura 1.** Dibujo que muestra las estructuras del perineuro (P) y el endoneuro (En). Se esquematiza como el estroma endoneural rodea a las fibras nerviosas (NF) enclavadas en la matriz compuesta de fluidos, fibras de colágena, vasos sanguíneos y células que confluyen con la superficie del perineuro (Thomas and Jones., 1967).

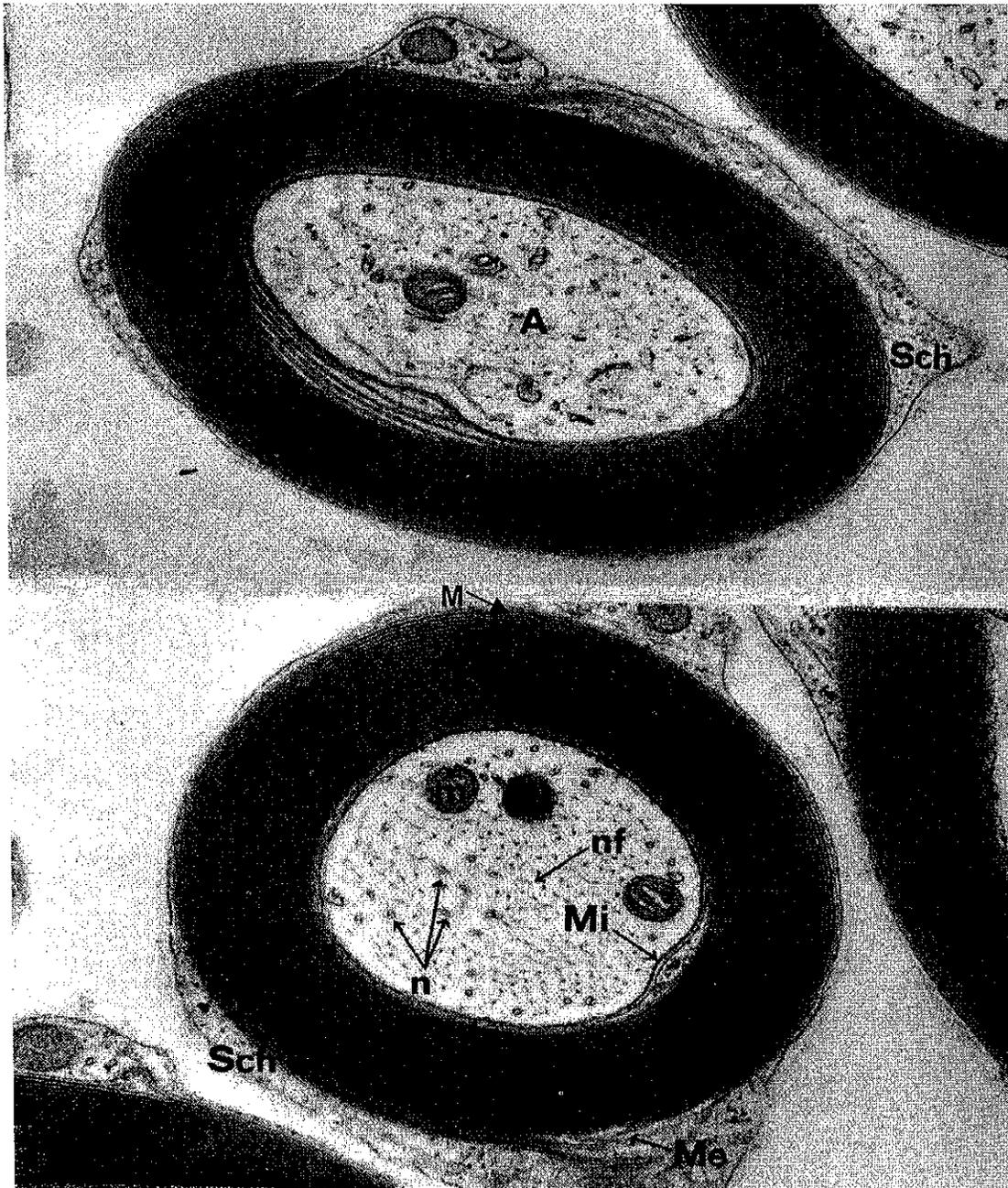


**Figura 2.** Corte transversal en donde se observa fibras de colágeno que separan al epineuro = Ep, perineuro = Pn, endoneuro = En y fascículos = Fs (Dørup y col., 2000).

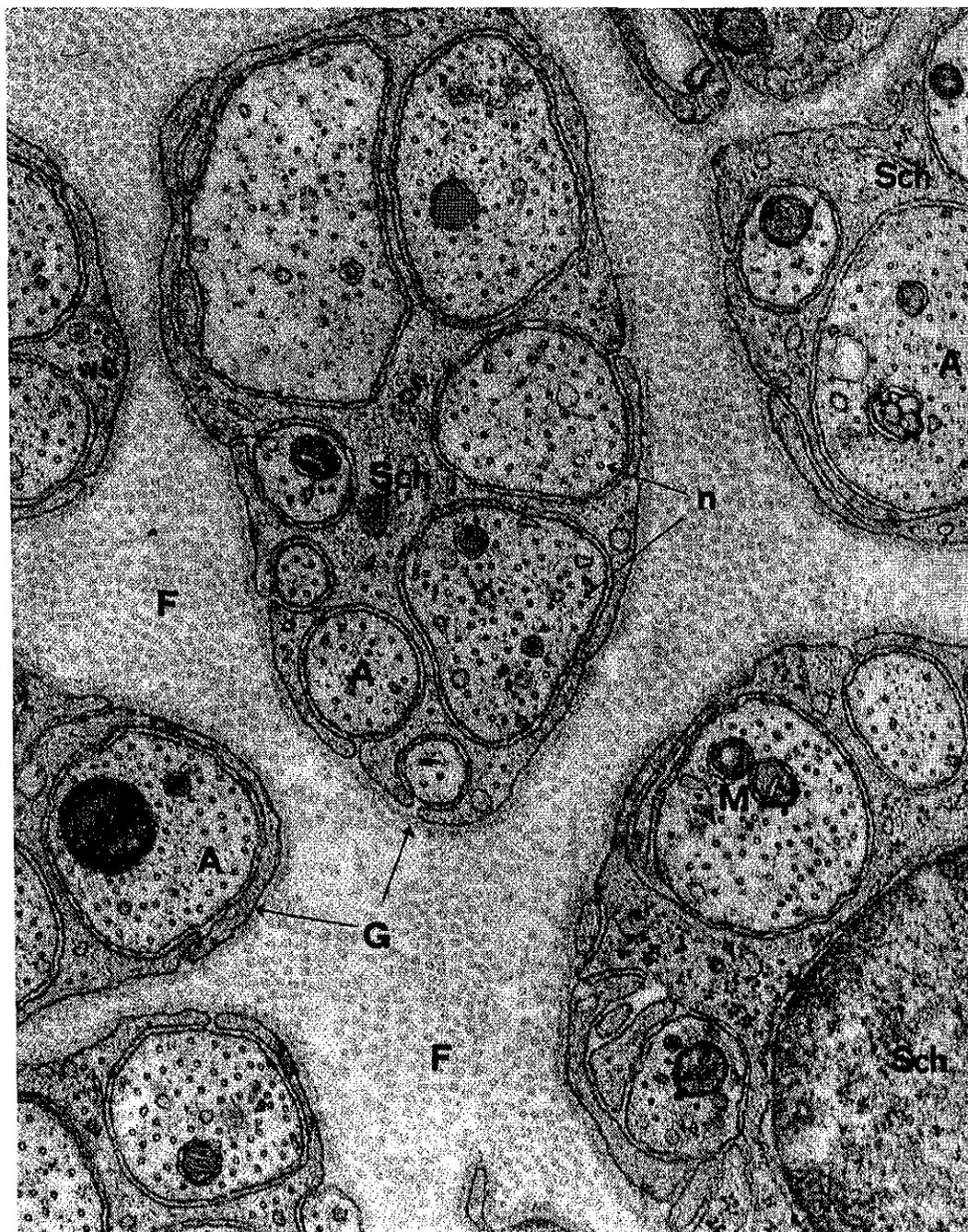
Los neonatos humanos empiezan a mielinizar sus axones conforme maduran y cuanto mas grande sea el calibre del axón mayor es el espesor de mielina, esta envoltura le confiere alta resistencia mecánica y eléctrica. La mielinización de las fibras se da cuando hay varias condiciones ya establecidas; como la interacción de células de Schwann con los axones, el tipo de fibra, la función que va a realizar ya sea motora o sensitiva y su calibre. Todo inicia cuando las células de Schwann expresan marcadores de liberadores de los factores de crecimiento nervioso (RNFG) y las moléculas de adhesión neural (N-CAM) inducen el contacto axón con las células de Schwann. Esto estimula la síntesis de los genes de la proteína cero (P0) y de la proteína básica de mielina, que es una glucoproteína asociada a la mielina, además de los galactolípidos. Todos en conjunto provocan que los lípidos y la proteínas que constituyen a la mielina formen rápidamente numerosas vainas de mielina y envuelvan a los axones (Garbay y col., 2000; Melgacani., 2000)

Las fibras mielinizadas transmiten con mayor rapidez el impulso nervioso, tienen un diámetro de 1 a 15  $\mu\text{m}$  y son eficientes conductores de impulsos a diferentes órganos blancos incluyendo al músculo. El diámetro y espesor de la vaina de mielina es de 0.7 $\mu\text{m}$  y la conducción del impulso a través del axón es de tipo saltatoria. Estas fibras constituyen el 8 % del total de las fibras que conforman un nervio periférico y por lo general son fibras motoras (figura 3) (Hitomi y col., 1997; Garbay y col., 2000).

Las fibras no mielinizadas son pequeñas, de aproximadamente 1  $\mu\text{m}$  de diámetro, pueden estar envueltas por vestigios de mielina o en invaginaciones de células Schwann, conducen los impulsos nerviosos mas lentos y su número es elevado ya que conforman el 92 % de las fibras que constituyen a la totalidad de un nervio periférico. La mayor parte son fibras sensitivas, aunque existen escasas fibras no mielinizadas que son motoras, y aunque no están cubiertas por su citoplasma, están envueltas por su plasmalema que envuelve el cilindro eje formando el mesoaxón. Una sola célula de Schwann puede envolver varias fibras de este tipo (figura 4) (Hitomi y col., 1997).



**Figura 3.** Se muestra fibras nerviosas mielinizadas en un corte transversal con microscopia electrónica (62,000 x) **M** = vaina de mielina derivada de las células de Schwann (**Sch**); **A** = axón con axoplasma provisto de neurotúbulos (**n**), neurofilamentos (**nf**), mitocondrias (**m**), **Mi** = mesoaxón interno; **Me** = mesoaxón externo (Pietro M., 1974)..



**Figura 4.** Se observan fibras amielinicas en una fotomicrografia (62,000 x). Se aprecian numerosos axones (A) contenidos en el citoplasma de una sola célula de Schwann. Los neurotúbulos (n) y las mitocondrias (m), están en el axoplasma y las membranas plasmáticas de las células de Schwann (Sch) están revestidas por una fina lamina limitante (glicocáliz) (G), a la que están unidas numerosas fibrillas de colágena (F) (Piettro, 1974).

### Origen y distribución del nervio ciático del perro.

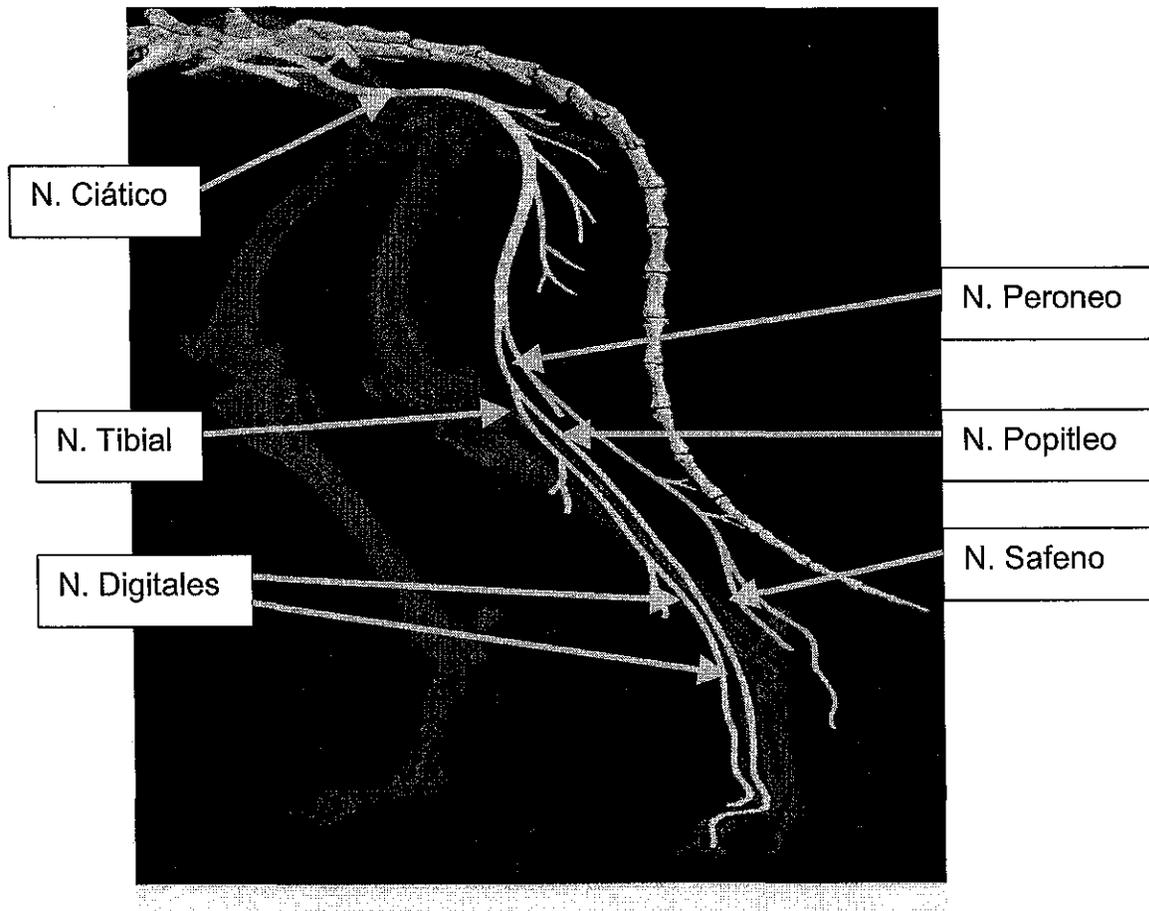
En el transcurso longitudinal de la médula espinal por el canal intervertebral, ésta emite treinta y seis o treinta y siete pares de nervios espinales que emergen del canal por los agujeros intervertebrales distribuidos en las regiones: cervical, torácica, lumbar y sacra.

De las ramas ventrales de los últimos nervios lumbares y los primeros nervios sacros, se forma el plexo nervioso llamado lumbosacro, que a su vez da inervación a todo el miembro pelviano mediante los siguientes nervios: por la cara interna del muslo emerge el nervio femoral, que da inervación motora y sensitiva al músculo recto interno, pectíneo abducen. Por la escotadura ciática mayor aparece el nervio ciático, que da inervación a la cara externa del muslo que está formado por los músculos semitendinoso, semimembranoso y vastos externos del cuadriceps femoral (figura 5).

Posteriormente, el nervio ciático se dirige hacia la rodilla del miembro y se bifurca, dando origen a dos nervios llamados nervio tibial y peroneo, a su vez el nervio tibial da origen a los nervios digitales; del peroneo se desprende el nervio popíteo y nervio safeno (figura 6) (López-Antunez, 1990; Sisson y col., 1982).



**Figura 5.** formación del plexo lumbosacro y origen anatómico del nervio ciático del perro (Gil y col., 1997).



**Figura 6.** Distribución del nervio ciático del perro (Gil y col., 1997).

### **Degeneración nerviosa tras lesión.**

Después de la sección de un nervio, la primera degeneración llamada anterógrada se produce en el extremo distal de las fibras nerviosas (degeneración Walleriana), luego se manifiesta el efecto en las fibras proximales a la lesión (degeneración retrógrada) (Chaudhry y col., 1992; Dumitru y col., 1994), en donde el soma neuronal muestra cambios de severidad variable que pueden ocasionar hasta la muerte neuronal. A este tipo de lesión se le llama degeneración axonal o reacción axonal (Dumitru y col., 1994; Ganong y col., 1997), y el mecanismo de desintegración del citoesqueleto axonal difiere entre especies (Miledi y col., 1970).

En roedores puede iniciar la degeneración desde las primeras 24 hrs. (Miledi y col., 1970; Bailey y col., 1993), por lo contrario, en humanos y gatos, el axoplasma permanece intacto por 3 días. También se ha demostrado que el

tamaño de la fibra nerviosa, edad, temperatura, tipo de lesión, además del tiempo transcurrido, son factores que influyen sobre el tiempo de desintegración axonal (Chaudhry y col., 1992; Dumitru y col., 1994).

### **Cambios ultraestructurales que se presentan en un nervio periférico lesionado.**

En 1850, Waller describió la degeneración que sufren los nervios periféricos después de una lesión, descrita como degeneración Walleriana (Dumitru y col., 1994). Actualmente este término se aplica a los cambios fisiológicos tempranos de una secuencia nerviosa degenerativa resultante de la lesión nerviosa (Chaudhry y col., 1992). Inicialmente sucede desintegración granular del andamiaje que forma el citoesqueleto axonal (Chaudhry y col., 1992; Dumitru y col., 1994) y con la sección nerviosa resultan pérdida del axoplasma, desintegración de organelos con fragmentación de membranas y, finalmente, sólo persiste una vaina de mielina con residuos del axón, todos estos cambios dístales son consecuencia de interrupción del transporte axonal durante la cual se suspende el soporte trófico y nutritivo (Chaudhry y col., 1992).

Enseguida se afecta la vaina de mielina al inhibirse la síntesis de lípidos (Dumitru y col., 1994) y disminuye el contenido de mRNA en células de Schwann (Trapp y col., 1988), esto condiciona la fragmentación de la vaina de mielina (Chaudhry y col., 1992). Al final de la tercera semana poslesión nerviosa, en roedores y gatos, ha sucumbido la mielina con acúmulos de fragmentos de membranas que condicionan la presencia de células de Schwann y forman la llamada "banda longitudinal de Büngner", signo favorable para la regeneración axonal (Spencer y col., 1979). Mas tarde sucede la respuesta de macrófagos, estrechamente vinculadas con la degeneración y regeneración axonal (Hann y col., 1989; Horan y col., 2000).

Normalmente se encuentran macrófagos residentes en nervios periféricos a lo largo de la lámina basal de vasos endoneurales; en respuesta a lesión, ellos migran hacia las fibras degeneradas para realizar funciones fagocíticas (macrófagos adherentes). Se identifican desde las primeras 24 hr y su número

aumenta los primeros días poslesión (Stoll y col.,1989; Dumitru y col., 1994). En roedores, la depuración de detritus de mielina ocurre en un período de un mes y en humanos dura hasta 7 meses (Chaudhry y col., 1992). Se ha comprobado que los macrófagos producen citocinas como interleucina-1 (IL-1), que al parecer estimula la síntesis de NGF por células de Schwann denervadas (Lindholm y col.,1987).

### **Regeneración de nervios periféricos.**

Las primeras respuestas después de la lesión están encaminadas a incrementar la supervivencia neuronal, y para esto intervienen factores tróficos como el NGF (factor de crecimiento nervioso), FNT-3 (factor neuritogénico tipo 3), BFGF (factor básico de crecimiento de fibroblastos) y BDNF (factores de crecimientos derivados del cerebro), cuya síntesis es desencadenada por la glía (Salonen y col., 1987; Ide C., 1996). Después ocurre la formación de una matriz extracelular compuesta por laminina, colágena tipo IV, fibronectina y moléculas adhesivas neurales (Spector y col., 1993). Con la matriz se promueve la elongación de neuritas y la síntesis de mielina por células de Schwann, también intervienen fibroblastos perineurales (Spector y col., 1991b; 1991a; 1992; 1993; Danielsen y col., 1996) y moléculas de adhesión N-CAM, e IL1 (interleucina 1) y N-cadherina, implicadas en la unión celular axón-axón y axón-célula de Schwann (Ide, 1996; Smith, 1964). Funciones igualmente importantes también son realizadas por las integrinas alfa 1- beta 1 y alfa 6- beta 1 (Salonen y col., 1987; Ide, 1996). Por otro lado, adicionalmente la proteína cinasa C y GAP-43 intervienen en la actividad del crecimiento axónico (Salonen y col., 1987; Ide, 1996).

La regeneración nerviosa depende del tipo de lesión; lesiones por aplastamiento tienen mayor éxito en regenerarse por preservar la continuidad en la vaina endoneural, irrigación y citoarquitectura en el muñón distal (Mackinnon y col., 1984; Bridge y col., 1994). Por el contrario, secciones de nervios completos, con pérdida de un segmento, dificultan la regeneración axonal por la interrupción

del soporte trófico y se produce degeneración del segmento distal (Salonen y col., 1987; Spector y col., 1991b; Varón, 1993).

### **Eventos celulares en la regeneración nerviosa de un nervio periférico seccionado.**

Desde hace muchos años se propuso que "sustancias humorales", originadas de la lesión, influían sobre la regeneración axonal del nervio periférico (Forssman, 1989; Ramón y Cajal, 1928). En los últimos 30 años se ha confirmado la hipótesis de que complejos humorales, celulares y factores extracelulares están relacionados con el crecimiento axonal (Bailey y col., 1993). El paradigma experimental de colocar un tubo de silicona entre los dos segmentos de un nervio seccionado, ha permitido descubrir la secuencia de eventos durante la regeneración nerviosa (Weiss, 1944; Williams y col., 1987; Varón, 1993; Lundborg y col., 1994). La regeneración del nervio periférico comprende la formación de brotes axónicos, crecimiento y proyección del axón regenerado y, finalmente, la reinervación al tejido diana (formación de placa terminal) (Spector y col., 1992; Ide, 1996; Ganong, 1997). Se desconocen en su totalidad los factores implicados en la regeneración de nervios periféricos (Aguado y col., 1982). Sin embargo, estudios "in vitro" e "in vivo" han demostrado la importancia de la matriz extracelular para que suceda el crecimiento de neuritas (Davis y col., 1985; Salonen y col., 1987; Goran y col., 2000). La distinta capacidad regenerativa del SNC y SNP esta basada en la diferente composición y la localización de la matriz extracelular. El SNP contiene gran cantidad de membrana basal y colágena, y estas son escasas en el SNC (Salonen y col., 1987; Sanes y col., 1985).

Se sabe que la matriz extracelular está compuesta por laminina, colágena tipo IV, fibronectina y moléculas adhesivas neurales (Spector y col., 1993), y que durante la regeneración actúa como guía de axones y de células de Schwann (Ide, 1987; Chen y col., 1989). Cuando se tubuliza un nervio seccionado, el primer evento necesario para la regeneración nerviosa es la formación de una matriz fibrinoide acelular que actúa de puente entre ambos segmentos, lo que permite la emigración de células no neuronales y el crecimiento axonal (Salonen y col., 1987;

Bailey y col. 1993; Varón y col., 1993). Más tarde aparece la fibronectina (FB) y la laminina (LMN), glucoproteínas que están presentes en la lamina basal con efectos en el crecimiento axonal (Bailey y col., 1993). Experimentos in vitro han descrito la importante participación de colágena tipo I y IV, fibronectina y laminina para que suceda adhesión de neuritas al substrato (Davis y col., 1985). La laminina está presente en todas las membranas basales y es indispensable para que suceda regeneración axonal (Salonen y col., 1987). Su presencia permite la regeneración más rápida tras aplastamiento nervioso, que cuando se produce sección nerviosa completa (Ide, 1983; Salonen y col., 1987; Varón y col., 1993).

Una vez formada la matriz extracelular y la red fibroblástica, las células de Schwann se reorganizan y migran a lo largo de los puentes de tejido fibroblástico (Salonen y col., 1987; Williams y col., 1993; Madison y col., 1994) y se forman rebrotes axónicos conocidos como pinceles neurofibrilares (Dumitru y col., 1994; Smith y col., 1984), ellos penetran el área dañada, algunos se reabsorben y otros persisten para contribuir en la formación de un axón dominante (cono de crecimiento axónico). Posteriormente, las terminales axónicas continúan su crecimiento emitiendo colaterales (neuritas) y se distribuyen con movimientos ameboides hacia el área lesionada (Dumitru y col., 1994). En mamíferos crecen a una velocidad que va de 0.15 hasta 4.0 mm / de longitud por día (Varon y col., 1993; Dumitru y col., 1994; Ganong y col., 1997), y cuando el axón finalmente alcanza la porción distal del tubo, las células de Schwann se alinean y empiezan a enrollarse formando una estructura membranal multilaminar precursora de la vaina de mielina (Dumitru y col., 1994; Smith y col., 1984).

En humanos, esto sucede dentro de los primeros 9-20 días, así el axón incrementa su longitud en una dirección de proximal a distal en un promedio de 4 mm / día (Kable y col., 1988; Dumitru y col., 1994), después se separan las células de Schwann y forman los nodos de Ranvier y la región internodal (Dumitru y col., 1994; Ganong y col., 1997). En humanos la maduración completa de la vaina de mielina puede tomar hasta un año (Dumitru y col., 1994; Navarro y col., 1994).

Después de la lesión, la recuperación funcional depende de la capacidad de regeneración de los axones lesionados y de la reinervación hacia el órgano

diana correspondiente (Navarro y col., 1994). Las funciones nerviosas autónomas, sensitivas y motoras no se restauran totalmente, excepto en niños (Lundborg y col., 1982; Navarro y col., 1994; Ganong y col., 1997). Las fibras nosciptivas son las primeras en regenerarse y los axones de menor diámetro tienen mayor capacidad de reinervar áreas grandes en comparación con axones de mayor calibre y mielinizados (Navarro y col., 1994; Ganong y col., 1997).

### **Participación de los neuroesteroides en la regeneración nerviosa.**

Los neuroesteroides, son aquellos que se sintetizan en tejido nervioso central y en nervios periféricos, independientemente de la actividad glandular esteroideogénica. Se forman a partir de las cadenas colaterales del colesterol mediante la participación de la enzima citocromo P450<sub>scc</sub> en las membranas internas de las mitocondrias que convierten el colesterol en pregnenolona y esta da origen a la progesterona que es tradicionalmente la principal hormona gonadal femenina (Baulieu y col., 2000; Jung-Testas y col., 1994).

También se ha descubierto que los neuroesteroides, en condiciones fisiológicas, ejercen funciones neuromoduladoras y actúan como neurotransmisores sobre el tejido nervioso, ya que inhiben al receptor nicotínico neuronal de la acetilcolina, activan los receptores hipotalámicos de la oxitocina, glicina y glutamato. En tejido nervioso lesionado inhiben la astrogliosis mediante mecanismos genómicos y no genómicos y mediante una regulación autocrina-paracrina favorecen la síntesis de mielina periférica activando los genes específicos estimuladores de la síntesis de mielina, como la proteína cero (PO) o la proteína de mielina periférica (PM22) (Engel y col., 2001; Baulieu y col., 1997; 2000; Garbay y col., 2000; Jung-Testas y col., 1989; 1994).

Por varios trabajos se comprobó que señales de bajos niveles de 3beta-hidroesteroide, sintetizada en células de Schwann, estimulan la formación de progesterona, pues se observa que el RNAm de la dehidrogenasa sintetiza (3H) progesterona proveniente de (3H) pregnenolona (Jung-Testas y col., 1994; Baulieu y col., 1997; Desarnaud y col., 1998; Chen y col., 1989; Wise y col., 2001; Robert y col., 2001). También se ha demostrado que los neuroesteroides intervienen de

manera muy importante durante la regeneración nerviosa acelerando la maduración de axones regenerados y aumentando la sobrevivencia neuronal (Koenig y col., 1995; Jung-Testas y col., 1994; Baulieu y col., 1997; Desarnaud, 1998; Chen y col., 1989; Wise y col., 2001; Baulieu y col., 2000; Robert y col., 2001).

Recientemente se utilizaron los neuroesteroides con buenos resultados en la regeneración del nervio ciático de la rata (Gómez-Pinedo y col., 2001) y en la regeneración de la rama bucal del nervio facial del conejo (Chávez-Delgado y col., 2001)

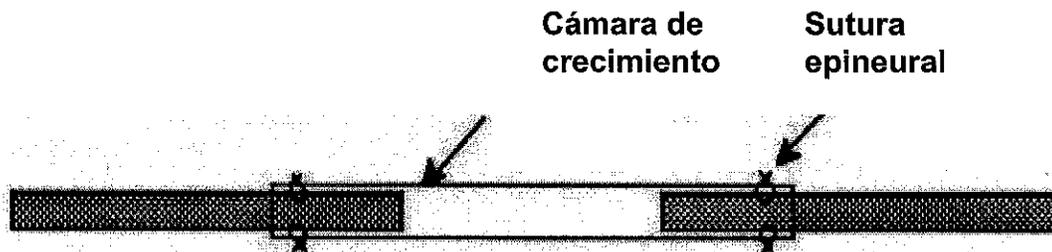
### **Antecedentes históricos y características de las cámaras axónicas y de los materiales orgánicos e inorgánicos que se han utilizado para fabricarlas.**

Aunque los métodos de sutura para la reparación de nervios seccionados se desarrollaron en el siglo XVII (Spector y col., 1991b), las técnicas de tubulización nerviosa evolucionaron espontáneamente a la mitad del siglo XIX (Ramón y Cajal, 1928; Spector y col., 1991b). Originalmente se usó la "tubulización" como un método de neurografía ante las ausencias de materiales adecuados para sutura (Brian y col., 1991; Kelleher y col., 2001). La silicona ha sido uno de los materiales más estudiados con modelos animales (Spector y col., 1991ab), y de los nervios periféricos el nervio ciático de la rata (Chen y col., 1989) y de los craneales la rama bucal superior del nervio facial del conejo han sido los más utilizados (Chongliang col., 1992; 1993; Varón y col., 1993; Lundborg y col., 1994). Esto ha permitido investigar los eventos moleculares y celulares implicados en la regeneración nerviosa (Lundborg y col., 1982; Salonen y col., 1987; Williams, 1987; Danielsen y col., 1988; Bailey y col., 1993).

Otros biomatemateriales utilizados para tubulizar han sido el gortex (Terris y col., 1993), el millipore (Campbell y col., 1961), el surgicel (Gabrielson y col., 1996), la colágena (Braun y col., 1966; Yoshii y col., 2001), el ácido poliglicólico (Pham y col., 1991) y materiales endógenos como duramadre, vena y componentes de membrana basal (Terris y col., 1993; Brian y col., 1991).

Recientemente se ha utilizado el biomaterial quitosana para la elaboración de prótesis en la técnica de tubulización para la regeneración del nervio ciático de la rata (Gómez-Pinedo y col., 2001) y la rama bucal del nervio facial del conejo (Chávez-Delgado y col., 2001).

La cámara de crecimiento, o tubo, que actúa como un cable de orientación para el rebrote de axones, reduce el número de puntos de sutura, permite la concentración de los factores tróficos y mitogénicos naturalmente producidos por los axones lesionados, y mantiene la comunicación química entre los extremos proximales y distal del nervio seccionado (figura 7) (Brian y col., 1991; Spector y col., 1991b).



**Figura 7.** Dibujo que simula la prótesis en forma de tubo que ayuda a formar la cámara de crecimiento axónico sujeta a los muñones por suturas epineurales.

Por otro lado, el tubo permite la aplicación "in situ" de diversos compuestos al nervio lesionado (Kanje y col., 1988); como precursores de matriz extracelular de laminina (Salonen y col., 1987; Bailey y col., 1993), fibronectina (Williams y col., 1987; Bailey y col., 1993), solución salina, plasma (Spector y col., 1991ab; 1993), factores tróficos y promotores de neuritas (FNT y FPN) (Chen y col., 1989; Chongliang y col., 1992; Spector y col., 1993; Varón y col., 1993), factor básico de crecimiento de fibroblastos-bFGF (Danielsen y col., 1988; Bates y col., 1991) y el factor de crecimiento tipo I semejante a la insulina (IGF-I), entre los principales (Sjberg y col., 1990).

Gracias a la actualización de la técnica y el adecuamiento de los materiales a utilizar, se han identificado los principales factores que modulan la regeneración exitosa de nervios tubulizados como: variaciones en el diámetro del tubo (Williams y col., 1987), distancia entre los segmentos (Williams y col., 1993; Spector y

col., 1991ab; 1993), el uso o no de compuestos tróficos (Kanje y col., 1988; Chongliang y col., 1992), el tipo de materiales (Brian., 1991; Terris y col., 1993), el uso o no de precursores de matriz extracelular, laminina, fibronectina (Bailey y col., 1993) y el tipo de lesión (Hurtado y col., 1987; Spector y col., 1992; Rende y col., 1991).

### **Tubulización y regeneración de nervios periféricos seccionados.**

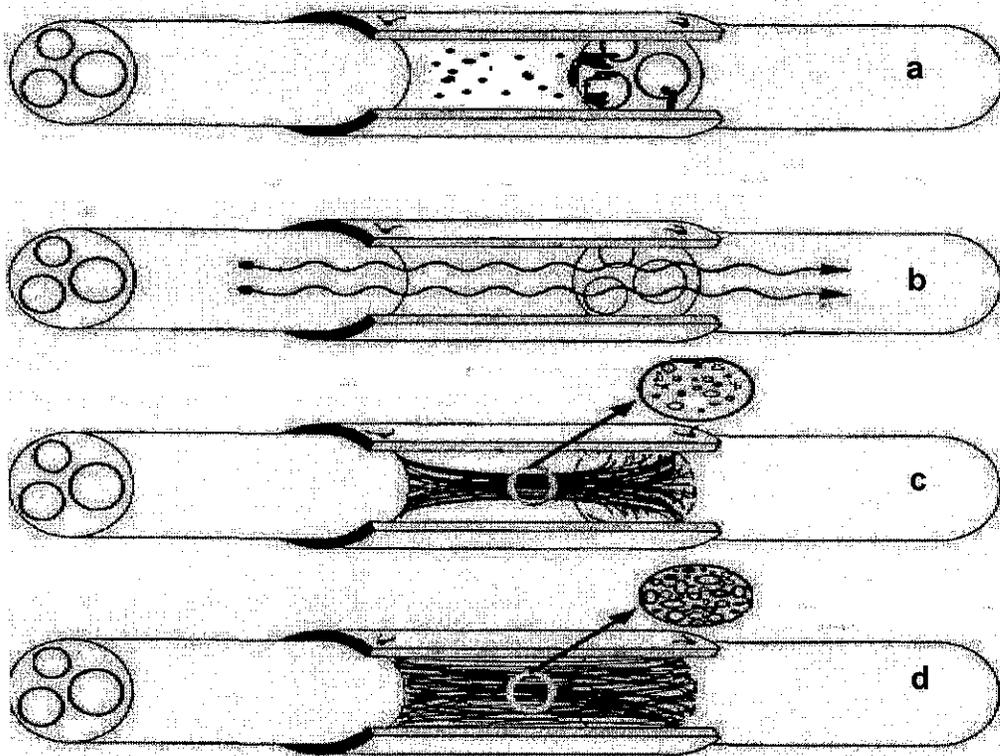
La regeneración facilitada por los tubos comienza con la concentración de líquido acelular en la cámara axónica (Brian y col., 1991); están presentes suero, sangre, líquido extracelular y detritus citoplasmáticos, incluyendo organelos intracitoplasmáticos provenientes de los segmentos nerviosos proximal y distal (Spector y col., 1991ab). Adicionalmente están presentes factores neurotróficos y promotores de neuritas con efectos sobre el crecimiento y migración celular, mitogénesis y elongación de neuritas (Varón y col., 1993; Ide, 1987; Williams y col., 1987). Después inicia el crecimiento de células mesodérmicas (fibroblastos perineurales) desde ambos extremos seccionados (figura 8-a) ((Williams y col., 1983), ellos sirven como soporte estructural para orientar la migración de axones y células de Schwann (Salonen y col., 1987; Williams y col., 1987; Bailey y col., 1993).

Las bandas de fibrina y la colágena forman vías para el rebrote de neuritas y contribuyen a formar el epineuro primitivo (Spector y col., 1991a; Yoshii y col., 2001). En este estadio, migran macrófagos fagocíticos (Spector y col., 1991a; Varón y col., 1993). Más tarde las neuritas realizan movimientos ameboides y alcanzan el extremo distal, entonces las células de Schwann envuelven el axón para iniciar el proceso de mielinización (Dumitru y col., 1994). Al finalizar este estadio, pueden distinguirse axones no mielinizados y en proceso de mielinización (rodeados por células de Schwann) y las neuritas todavía no han alcanzado su órgano diana (músculo) (figura 8-b) (Spector y col., 1991a). Después, los nervios empiezan a agruparse en fascículos separados por estructuras de colágena, fibroblastos perineurales y vainas con células de Schwann, estructuras

precursoras del epineuro y perineuro primitivo (figura 8-c) (Dumitru y col., 1994; Ganong y col., 1997).

En este periodo se ha alcanzado una organización fascicular definitiva, el perineuro rodea grupos de axones que continúan su proceso de maduración hasta alcanzar una reorganización (figura 8-d) (Brian y col., 1991; Spector y col., 1991ab; Varón y col., 1993).

Estos métodos han tenido una aplicación clínica limitada por el desconocimiento de las complicaciones que causan efectos secundarios cuando se aplica a nervios humanos (Brian y col., 1991; Terris y col., 1993; Danielsen y col., 1996), y pese a estos beneficios limitados, el recurso de tubulización es una herramienta para monitorear el entorno del nervio en regeneración (figura 8) (Brian y col., 1991).



**Figura 8.** Se observan las diferentes etapas de la regeneración de nervios periféricos axotomizados que fueron reparados mediante la técnica de tubulización, **a** = prótesis uniendo a los dos muñones, **b** = después de la axotomía tubulización los factores neurotróficos inician con la formación de la lamina basal extracelular **c** = se forman los conos de crecimiento que proyectan los primeros neurofilamentos **d** = se presenta la regeneración de muñón a muñón (Brian y col., 1991).

**Ventajas de la utilización del biomaterial quitosana en la reparación nerviosa.**

En la reparación de lesiones experimentales de nervios periféricos, con pérdida de un segmento, la tubulización con silicona ha producido buenos resultados, incluso también cuando se ha aplicado en seres humanos (Lundborg y col., 1994). Sin embargo, la silicona no es absorbible, por lo que se necesita una segunda cirugía para retirarla (Saintigny y col., 1993). En comparación con la silicona, la quitosana también resulta de baja toxicidad para los tejidos (Muzzarelli y col., 1994; Yoshimoto y col., 1995). Además ofrece las ventajas de permitir la liberación local y prolongada de compuestos al actuar como vehículo porque permite la incorporación de sustancias promotoras del crecimiento nervioso, evitando con esto los efectos colaterales indeseables de un tratamiento sistémico, y con el paso del tiempo, desaparece al ser degradada por lisosimas tisulares (Rao y col., 1997).

Recientemente se publicaron trabajos en donde se demostró la gran afinidad de la quitosana con las células nerviosas, al utilizarla como vehículo de liberación prolongada de sustancias que crean un adecuado microambiente para la regeneración nerviosa (Haipeng y col., 2000). También se obtuvieron buenos resultados cuando se mezclaron células de Schwann y factor de crecimiento nervioso suspendidos en la matriz de la quitosana como vehículo e infiltrados en cámaras de silicona para reparar defectos de 10 mm del nervio ciático de ratas (Wu, 1997), de la misma forma, también se mezcló la quitosana con diferentes neuroesteroides logrando regenerar el nervio ciático de la rata y la rama bucal del nervio facial del conejo (Gómez-Pinedo y col., 2001; Chávez-Delgado y col., 2001).

En otros estudios se compararon los efectos de la quitina y de la quitosana en cultivos *in vitro* de células de Schwann del nervio ciático, resultando con mayor histocompatibilidad la quitosana (Kuang, 1998).

### **Algunas propiedades inmunológicas y aplicaciones de la quitosana en el área biomédica.**

Desde hace aproximadamente 12 años se tiene conocimiento del uso de la quitosana en la área biomédica, y a pesar de sus variados usos, que por lo general son encaminados para ser utilizados en humanos, hasta hace muy poco tiempo los investigadores han dirigido su esfuerzo para analizar las propiedades inmunológicas de este biomaterial. Aunque se conocen todas las propiedades físico-químicas de la quitosana, no se sabe plenamente que sucede cuando es aplicada en el organismo. Recientemente se comparó el efecto antimicrobial de la quitosana contra el efecto del aminoácido taurina, del cual ya se conoce que tiene propiedades regulatorias del proceso inflamatorio, ambos fueron administrados a grupos de perros para corregir fenestraciones defectuosas del hueso maxilar y vestibular. Posteriormente al tratamiento, estas estructuras fueron observadas con microscopia de luz y se demostró que la quitosana tubo mayor efecto antimicrobial que la taurina, ya que ésta contenía mayor número de macrófagos y neutrofilos, esta actividad antimicrobial aumentó cuando se mezcló taurina con quitosana (Ozmeric y col., 2000).

En otro estudio se utilizó la quitosana para inmunizar vía intranasal a conejos, mezclando la quitosana con la toxina inactiva de difteria (CRM197). Los resultados se compararon con los resultados de una vacunación convencional, utilizando solamente la vacuna contra difteria. El grupo de animales que recibió quitosana con la vacuna demostró una mayor respuesta por parte de las células T, predominando la respuesta de los Th2 (linfocitos T- Helper) (Edel y col., 1999).

Entre los usos más comunes de la quitosana están; preparación de cremas cicatrizantes, suturas quirúrgicas, tratamientos dérmicos, quemaduras, reparación de tejido conectivo, y óseo, epitelio de revestimiento, fabricación de lentes de contacto, vehículo para encapsulamiento o liberación prolongada de diversos tipos de fármacos, aditivo dietético para reducción de peso, estabilizador y preservativo de alimentos manteniendo el pH (Muzzarelli y col., 1999; Kas y col., 1997; Felt col., 1998; Acikgoz y col., 1995).

### **Ontogenia del sistema inmunológico del perro.**

El perro proviene de una gestación múltipara con un periodo de 60- 63 días y su desarrollo fetal se relaciona con la maduración de los órganos linfáticos (cuadro 1) (Snyder y col., 1993).

**Cuadro 1.** Desarrollo de órganos linfáticos en la gestación del perro (Tomado de Miller y col., 1985; Snyder y col., 1993).

Días de gestación	Desarrollo de órganos linfáticos
27-28	El bazo y el timo son evidentes
35	El timo desciende desde la región cervical al interior de la cavidad torácica que esta compuesta por lóbulos epiteliales y estroma mesenquimatoso solamente
35-40	El timo inicia con su actividad linfopoietica y empieza a mostrar los corpúsculos de Hassall y el bazo inicia con la linfopoiesis
45	El timo muestra histológicamente su apariencia normal postnatal
45-52	La infiltración linfocítica hacia los ganglios linfáticos y bazo, además se evidencian los linfocitos T que provienen del timo
60-63	Prominentes capilares y venulas se desarrollan en el tejido linfático periférico

### **Secreción y distribución de las inmunoglobulinas del perro.**

Las inmunoglobulinas del perro se encuentran distribuidas en los diferentes líquidos del organismo, (como se muestra en el cuadro 2) (Mazza y col., 1994; Yang y col., 1995; Tizard, 1996).

De todas las inmunoglobulinas, la que se sintetiza en mayor cantidad en el perro es la IgA, ya que es secretada hacia el suero y de forma predominante desde las células plásmicas de la lamina propia del intestino (Karl, 2000).

In-vitro se observa que es secretada de manera significativa por el bazo, e in vivo en glándulas lagrimales, salivales, intestinales y lácteas, lo que le confiere la capacidad de participar en la defensa local contra infecciones. Tiene la característica de no ser destruida por las enzimas digestivas, ayudando a

conservan en buen estado de salud el canal gástrico y las mamas de los animales (Hogen y col., 1992a).

Por otro lado, la inmunoglobulina IgM, al igual que la IgA, puede ser transportada a través de los epitelios mediante el receptor poli-Ig, pero con la particularidad de que esta inmunoglobulina es de un elevado peso molecular y representa el primer grupo de anticuerpos que se forman tras la inoculación de un antígeno, por lo que desempeña un papel importante en las reacciones de aglutinación y fijación del complemento (Donald y col., 1991).

Todos los fluidos intestinales contienen considerables cantidades de IgG, aunque relativamente existe poca en las células plásmicas que se encuentran en la lamina propia. Sin embargo, en una infección del sistema ganglionar linfático pueden ser IgG hasta un 60 % de los anticuerpos formados que toman parte en reacciones de aglutinación, precipitación, fijación del complemento y fijación de toxinas (Donal y col., 1991; Goedert, 2000).

**Cuadro 2.** Propiedades y distribución de las inmunoglobulinas en el organismo del perro (tomado de Halliwell y col., 1989; Mazza y col., 1994; Yang y col., 1995; Tizard, 1996).

Propiedades	IgG	IgM	IgA	IgE	IgD
Peso (kDa)	180,000	900,000	360,000	200,000	180,000
Concentración sérica mg/dl)	700-2000- IgG 1:300-1400 IgG 2:300-1400 IgG 3:<1-200	70-270	20-150	0.7-72	?
Saliva	0.5-5	0.5-7	17-125	?	?
Calostro	500-2200	70-370	150-340	?	?
Leche	10-30	10-54	110-620	?	?
Heces fecales	90-1070	50-160	80-540	?	?
Se transporta por placenta	Si	no	No	no	No
Se encuentra en la fijación del complemento	Si	si	No	?	?

## **Principios de la inmunodifusión radial para la determinación de inmunoglobulinas.**

Todos los métodos radiales de inmunodifusión se derivan de los trabajos realizados por Fahey y col, (1965) y de Mancini (1965). Estos métodos son específicos para la determinación cuantitativa, específica e individual de las proteínas de los diferentes grupos de fluidos biológicos. Mancini describió una relación lineal entre el volumen y la concentración de un antígeno en los líquidos.

Determinando esta concentración mediante una prueba que consistía en hacer reaccionar una proteína específica de un líquido de tal forma que ésta formara un anillo con un diámetro que dejaría de crecer hasta que terminara de expresarse la inmunoreacción de la proteína (inmunodifusión) los anillos dejan de crecer y conservaban siempre el mismo diámetro en concentraciones de proteínas y volúmenes iguales ya conocidos.

Relacionando estos resultados, se determinó que el registro de la concentración de una proteína específica es proporcional al diámetro del anillo que se forma de la precipitación de volúmenes ya conocidos. Esta relación es lineal cuando está se traza en una hoja logarítmica. El método es dependiente del tiempo y de la temperatura, puesto que el diámetro del anillo continúa hacia su punto final hasta completar la inmunodifusión de la proteína (Reynolds, 1970; Roitt y col., 2000).

### **Respuesta inmune humoral.**

Al poco tiempo de que Pasteur descubriera que el organismo podía producir resistencia contra los agentes infecciosos mediante la vacunación, se averiguó que las sustancias que dan esta resistencia se encontraban en el suero sanguíneo. Además otros descubrimientos dieron a conocer que en todos los líquidos del cuerpo se concentraban diferentes tipos de anticuerpos específicos que de una u otra forma defienden al organismo llamadas inmunoglobulinas (IgG).

Estas son proteínas que en la forma monomérica están constituidos por cuatro polipéptidos o cadenas, dos pesadas y dos ligeras, unidas, en la mayoría de las clases, por puentes disulfuro, y son estos anticuerpos los que

desencadenan la respuesta humoral en el organismo en presencia de un antígeno, hasta el momento se conoce las Inmunoglobulinas G, M, E, A, I. (Margini, 1997; Byrne y col., 2000).

En esta respuesta, el linfocito B se transforma en célula plasmática y produce la inmunoglobulina específica o necesaria de acuerdo al tipo de antígeno contra el que hay que defender al organismo (Yang y col., 1995; Donald y col., 1991; Luyn y col., 1998). Está comprobado que, en caso de una infección, el primer anticuerpo que se sintetiza para hacer contacto con el antígeno es la IgM, representando la respuesta inmune primaria. Desempeña un papel importante especialmente en las reacciones de aglutinación y fijación del complemento, a la vez que favorece la fagocitosis por leucocitos y macrófagos. Aunque en una segunda respuesta de defensa esta disminuye y se incrementa la IgG como respuesta a la persistencia crónica del antígeno. Se sabe que tiene numerosas reacciones defensivas pues precipita y aglutina y fija al sistema del complemento. Por otro lado, la IgA se forma en distintas glándulas lagrimales, intestinales, salivales y lácteas participando de esta manera en la defensa local contra infecciones manteniendo en buen estado el canal gástrico y las mamas, ya que nos son destruidas por las enzimas digestivas. La inmunoglobulina D se relaciona con los estados de estrés crónicos para hacer frente a infecciones y microorganismos patógenos. Por último, la IgE se fija a células de la piel desempeñando papeles muy importantes en las reacciones de hipersensibilidad frente a alérgenos (Yang y col., 1995; Mazza y col., 1994).

### **Fagocitosis.**

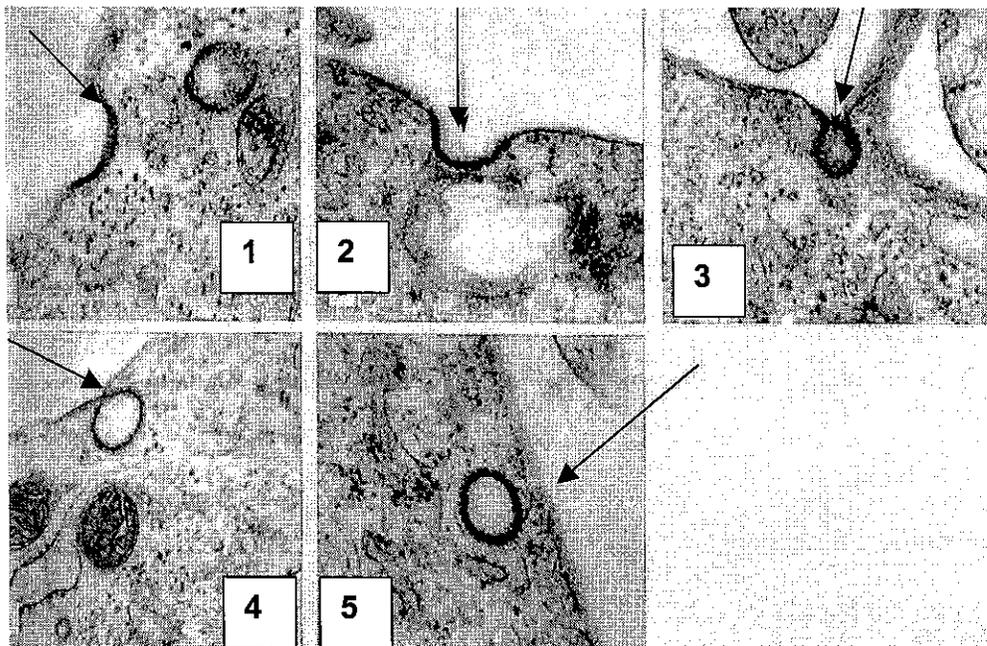
Un grupo importante de leucocitos son células fagocíticas, entre los que se encuentran los monocitos, macrófagos y los polimorfonucleares neutrofilos. Estas células se unen a los microorganismos, los ingieren y los destruyen, por lo que su misión es formar una primera línea de defensa frente a la infección. En la práctica entre los linfocitos y los fagocitos se establece una serie de interacciones importantes, por ejemplo, hay fagocitos encargados de ingerir los antígenos y mostrarlos después a los linfocitos T, transformados en compuestos químicos que

estos últimos son capaces de reconocer (presentación de antígeno). A continuación los linfocitos T liberan factores solubles conocidas como citocinas, que activan a los fagocitos y promueven la destrucción de los patógenos ingeridos (Mazza y col., 1994; Luyn y col., 1998).

Por otra parte, los anticuerpos liberados por los linfocitos B permiten a los fagocitos reconocer con mayor eficacia a los agentes patógenos, cada vez, con mayor frecuencia, el papel principal de los anticuerpos es la activación del complemento o la opsonización de las partículas que promueve su ingestión por parte de los fagocitos. Es por eso que, una vez que las células se unen a un microbio opsonizado, lo rodean mediante la emisión de pseudópodos. Estos se unen finalmente entre si, con lo que el microorganismo penetra en la célula fagocítica (endocitosis), quedando confinado en el interior del fagosoma.

Los fagocitos pueden tratar al material ingerido de diversas maneras, por ejemplo, los macrófagos reducen el oxígeno molecular y dan lugar a compuestos reactivos de oxígeno (CRO) que son secretados hacia el interior del fagosoma.

Los neutrofilos contienen lactoferrina que forma complejos con el hierro y priva a las bacterias de dicho metabolito esencial. Finalmente, los gránulos y los lisosomas celulares se fusionan con el fagosoma vertiendo al interior del mismo sus enzimas y dando lugar a un fagolisosoma en cuyo interior se digiere el material fagocitado (figura 9) (Anderson y col., 1988; Luyn y col., 1998).



**Figura 9.** Microfotografía electrónica del proceso de fagocitosis que muestran los diversos estadios de invaginación que culminan con la unión de la partícula opsonizada, y las células fagocíticas que la van incorporando en su interior de forma gradual mediante la emisión de pseudópodos (1-3). Posteriormente se fusionan (4) y el microorganismo es endocitado en un fagosoma (5) (Stevens y col., 2000).

### **Respuesta inmune celular.**

Otro sistema de defensa del organismo lo constituye los linfocito T, que al ser estimulado por un antígeno genera una fase de amplificaciones para ayudar al proceso inflamatorio a destruir células alteradas (Barnes y col., 2000; Olivry y col., 1997). Los linfocitos CD4 o T colaboradores (Th), se diferencian a su vez en dos poblaciones funcionalmente distintas, Th1 y el Th2; en donde el primero sintetiza y libera las citosina denominadas interleucina 2 e interferón g, que estimula a los macrófagos a degradar bacterias y parásitos que se replican en las vesículas intracelulares. Mientras tanto, los Th2 producen las interleucinas 4, 5, y 6 que cumplen funciones regulatorias como es la cooperación con los linfocitos B y los linfocitos CD8, que son los citotóxicos (Tc), porque destruyen las células infectadas con virus. Al mismo tiempo el interferón gama, libera enzimas proteolíticas que contienen gránulos secretorios de perforina, que son proteínas que forman canales en las membranas de las células atacadas y por estos

canales se escapa el material celular con la consiguiente destrucción (figura 9) (Margani, 1997; Sinke y col., 1997; Deeg y col., 1994; Gebhard y col., 1992; Luyn y col., 1998).

El cultivo *in vitro* de linfocitos es una técnica cuantitativa que se utiliza para valorar el estado de la respuesta inmune de tipo celular del organismo, ya que revela si se presenta proliferación de los mismos en condiciones experimentales al ser expuestos ante la presencia de posibles antígenos, como lo son los biomateriales, al mismo tiempo que se compara con organismos controles que no fueron expuestos (Wooley y col., 1996).

### **Comportamiento de la respuesta inmune por la presencia de biomateriales en el organismo.**

Las prótesis que se aplican en el humano, manifiestan diversos signos de daño tisular e inflamación local, como por ejemplo; prótesis mamarias, marcapasos, catéteres, válvulas cardíacas o prostáticas, cámaras de crecimiento nervioso, placas y tornillos usados en traumatología, ortopedia o como consecuencias iatrogénicas o simplemente por la naturaleza química del material (Anderson y col., 1988; Luyn y col., 1998). Se ha observado una frecuente respuesta inflamatoria ante la presencia de los diferentes biomateriales de origen natural que se utilizan como implantes o prótesis, aunque estos no sean tóxicos para el organismo.

Sin embargo, estos absorben proteínas hacia su superficie y atraen fagocitos desencadenando una respuesta inflamatoria que a su vez se manifiestan con aumento de la inmunoglobulina IgG y fibrinógeno, pudiendo con esto también desencadenar procesos trombogénicos (figura 10) (Tang, 1996; Luyn y col., 1998).

Estudios realizados a partir de 1977 indican los eventos que suceden en el organismo con el uso de implantes. Se ha determinado que la atracción de fagocitos, junto con el desencadenamiento de la cascada de coagulación y la activación de la respuesta inflamatoria, terminan por activar las proteínas del sistema del complemento, disparando el componente C1 asociado con IgG y GM y el C4 que es el responsable de la propagación de la cascada de los demás

componentes (C4, C2, C3, y C5) con sus subsecuentes cambios inmunológicos (figura 10) (Anderson y col., 1988).

### **Respuesta inflamatoria local ante la presencia de biomateriales.**

La inflamación es la respuesta del organismo frente a la invasión de un antígeno y esta puede ser leve o moderada dependiendo de la estructura química del biomaterial. Sus manifestaciones son rubor, tumor, dolor, disfunción, y presencia o no de material piógeno (Anderson y col., 1988).

La inflamación se activa por las quimocinas, por productos de los sistemas enzimáticos plasmáticos integrados por el sistema de coagulación, el sistema fibrinolítico (plasmina), el sistema de cinina y el sistema del complemento. El sistema de cinina genera los mediadores bradicinina que se produce tras la activación del factor XII de la coagulación, es un nonapéptido vasoactivo que dilata las venulas, aumentando la permeabilidad vascular. Además de inducir la contracción de la musculatura lisa, este sistema también produce la lisibradicinina por la acción de las enzimas de los tejidos dañados (Anderson y col., 1998; Mateos- Rodríguez y col., 1998).

Por otro lado, los mastocitos, basófilos y las plaquetas son importantes fuentes de los mediadores vasoactivos histamina y la 5-hidroxitriptamina (serotonina) que producen vasodilatación y aumento de la permeabilidad vascular.

Al mismo tiempo, los mastocitos y los basófilos pueden ser sensibilizados por la IgE para la liberación de gránulos que desencadenan la inflamación, aunque también las citocinas liberan IL-1 e IL-6 por todo esto el aumento del aporte sanguíneo local y el aumento de la permeabilidad capilar facilitan la migración celular manifestándose la inflamación como tal (Anderson y col., 1998; Mateos-Rodríguez y col., 1998; Roitt y col., 2000).



**PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.**

Se han realizado varios estudios con el fin de reparar y regenerar nervios periféricos seccionados, mediante el uso de técnicas tradicionales y utilizando diversos materiales como gortex, millipore, surgicel, ácido poliglicólico y silicona, entre otros sin embargo los resultados no han sido favorables.

En los últimos años se ha utilizado el biomaterial quitosana para fabricar prótesis y emplearlas para tubular los nervios como un método alternativo en la neurocirugía clínica. Con esta técnica se ha logrado regenerar 1 cm del nervio ciático de la rata (Gómez-Pinedo y col., 2001). Diversos estudios han demostrado que, en condiciones fisiológicas, los neuroesteroides ejercen funciones neuromoduladoras, además de actuar como neurotransmisores sobre el tejido nervioso, pero en respuesta a una lesión inhiben la astrogliosis reactiva y favorecen la síntesis de mielina periférica (Jung-Testas y col., 1989; 1994). En trabajos previos se comprobó que utilizando quitosana combinado con esteroides se inducía la regeneración del nervio ciático de la rata (Gómez-Pinedo y col., 2001) y la regeneración de la rama bucal del nervio facial del conejo (Chávez-Delgado y col., 2001).

A pesar del conocimiento del uso de la quitosana en el área biomédica, no existen estudios que indiquen si este biomaterial por si solo o combinado con esteroides altera la respuesta inmune al ser aplicado en el organismo de aquí la importancia de realizar estudios como el presente para valorar sus efectos.

**HIPÓTESIS.**

Se puede lograr la regeneración del nervio ciático axotomizado del perro mediante una prótesis orgánica de quitosana con y sin esteroides sin afectar su sistema inmunológico.

**OBJETIVO GENERAL.**

Evaluar histológica e inmunológicamente la aplicación de una prótesis bioactiva de quitosana y esteroides en la regeneración del nervio ciático del perro.

**OBJETIVOS PARTICULARES.**

- 1.-Realizar un análisis morfométrico para cuantificar el número de axones mielinizados y no mielinizados en los diferentes grupos.
- 2.-Determinar si hay o no degeneración Walleriana en el muñón distal.
- 3.-Determinar el índice de ingestión (total de levaduras ingeridas entre el número de fagocitos contados).
- 4.-Determinar el índice de digestión (total de levaduras digeridas / entre el número de fagocitos contados).
- 5.-Determinar el índice de fagocitosis (número de levaduras ingeridas + levaduras digeridas / entre el número de fagocitos contados).
- 6.-Determinar el porcentaje de fagocitos activos.
- 7.-Determinar el índice de estimulación linfocitaria.
- 8.-Cuantificar la concentración de las inmunoglobulinas IgG y IgM en suero de sangre periférica mediante radioinmunodifusión antes y después del implante.

## **MATERIALES Y MÉTODOS.**

Se utilizaron 20 hembras caninas raza french poodle adultas jóvenes de nueve meses, a un año y medio de edad, de  $6 \pm 2$  kg de peso. Se adquirieron en un criadero y fueron mantenidas en condiciones controladas de bioterio con agua y alimento balanceado ad libitum.

Diez y seis de las hembras se tranquilizaron con clorhidrato de promazina a una dosis de 5 mg / Kg, de peso, vía intramuscular, después se anestesiaron con pentobarbital sódico a una dosis de 20 mg / Kg vía intravenosa, para practicarles la extirpación de ovarios y útero a todas las hembras, esto para evitar los cambios hormonales relacionados con su ciclo estral.

Una vez recuperados los animales de la intervención quirúrgica, aproximadamente 15 días postcirugía, se practicó la axotomía de 15 mm del nervio ciático de la pierna izquierda y en solo 12 hembras se practico la tubulizaron.

A los 60 días posesión, se sacrificaron por inyección subletal de pentobarbital sódico intravascular y se disecaron los restos de las cámaras junto con los muñones proximal y distal para su posterior análisis mediante microscopía de luz y electrónica de transmisión, con el propósito de identificar los componentes tisulares y celulares presentes en el interior de la cámara de crecimiento axónico y el grado de regeneración axonal.

Para cada una de las pruebas inmunológicas, se tomaron 15 mililitros de sangre periférica de cada uno de los animales para determinar la concentración de las inmunoglobulinas IgG e IgM mediante radioinmunodifusión y realizar las pruebas de cultivo in vitro y de linfocitos y fagocitosis, para de esta forma analizar la respuesta humoral y celular por parte del organismo y valorar si el biomaterial quitosana provocó una alteración de la respuesta inmune.

**CONDICIONES EXPERIMENTALES.**

Los 20 animales fueron divididos en un grupo control no lesionado que solo se utilizó como testigo para determinar antes y después el efecto del estrés por aislamiento individual sobre la respuesta inmunológica y otro que fue axotomizado pero no tubulizado para determinar también la respuesta inmunológica antes y después del traumatismo quirúrgico. Tres grupos mas de 4 sujetos cada uno fueron tratados de la siguiente manera: un grupo fue axotomizado y tubulizado con prótesis de quitosana sin esteroides y dos grupos fueron axotomizados y tubulizados con prótesis de quitosana y esteroides precargados en su matriz.

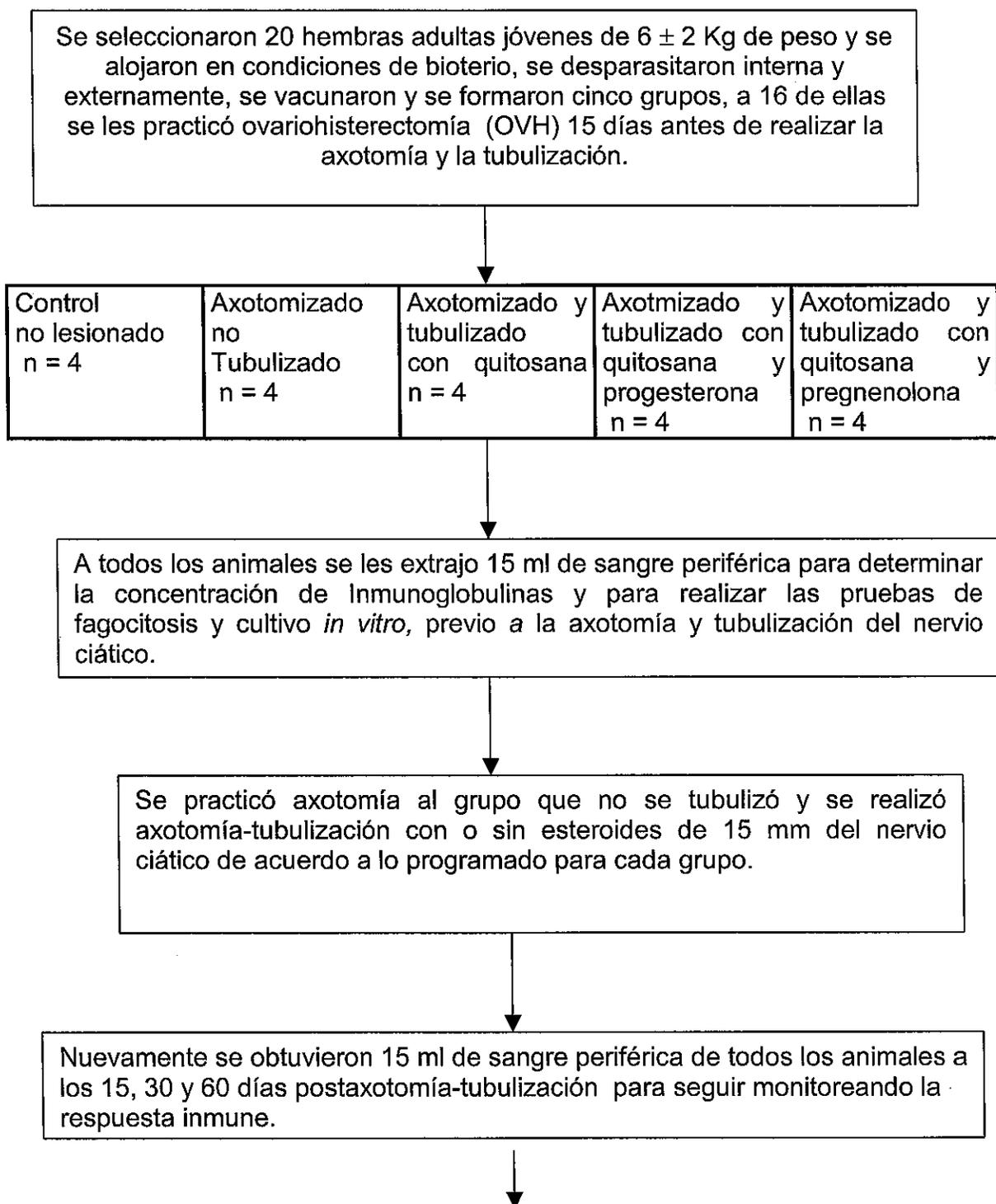
**Controles:**

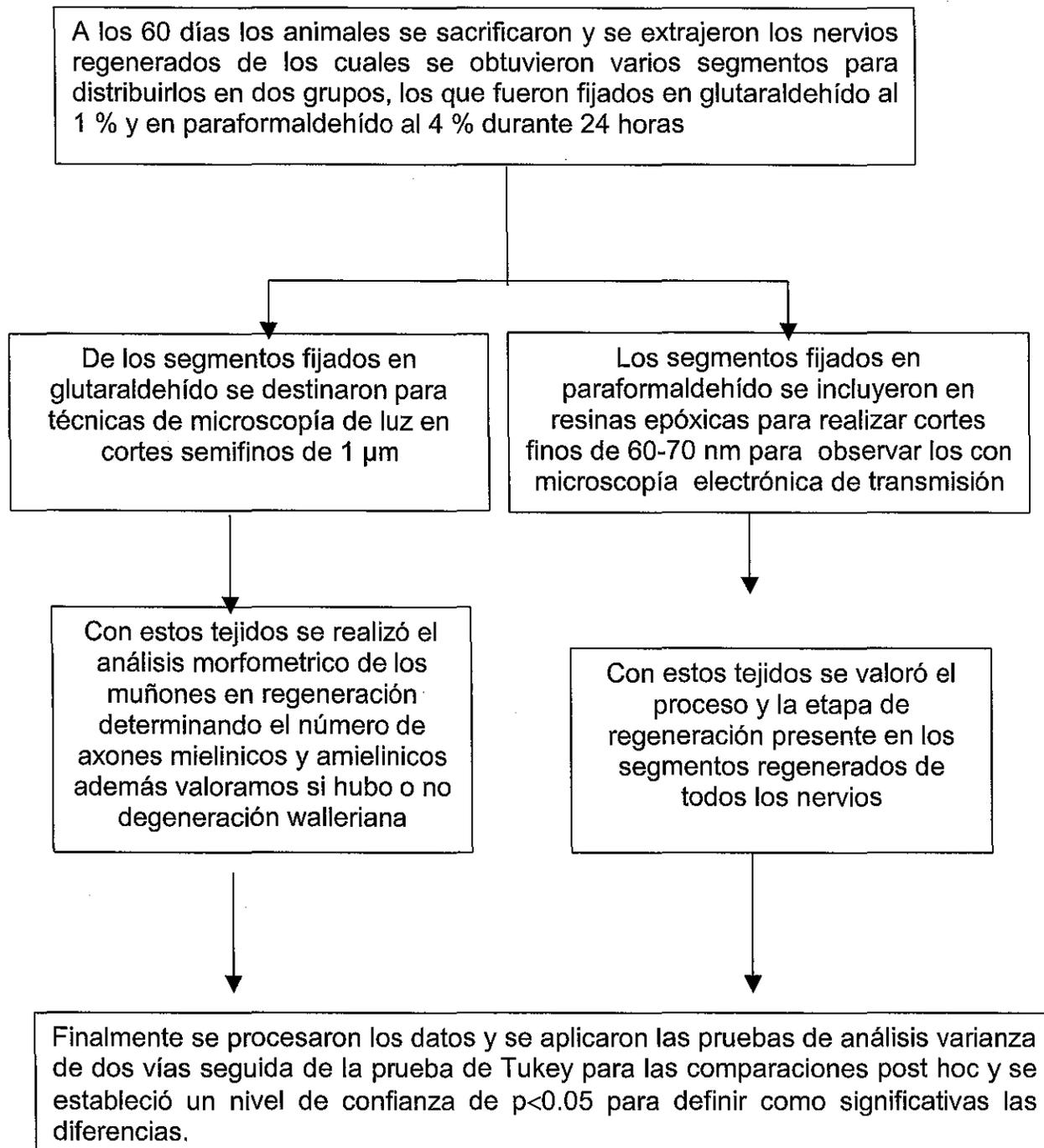
- 1.-Control no lesionado (se sometió solo aislamiento individual)
- 2.-Axotomizado no tubulizado (solo se secciono 15 mm del nervio ciático y se cerro la herida quirúrgica).

**Experimentales:**

- 3.-Se seccionó del miembro izquierdo 15 mm de nervio ciático y se tubulizó con una prótesis de quitosana sin esteroides que fueron incubadas previamente durante 24 horas en solución fisiológica al 0.9 %.
- 4.-Se seccionó del miembro izquierdo 15 mm del nervio ciático y se tubulizó con una prótesis de quitosana con (50 mg/tubo) de progesterona precargada en su matriz.
- 5.-Se secciono del miembro izquierdo 15 mm del nervio ciático y se tubulizo con una prótesis de quitosana con (50 mg/tubo) de pregnenolona precargada en su matriz.

## DIAGRAMA DE FLUJO QUE REPRESENTA EL DISEÑO EXPERIMENTAL.





### **Preparación de las prótesis de quitosana.**

Se utilizaron caparazones de camarones cocidos que fueron deshidratados a 60 °C durante 48 horas en una estufa, en donde el material desecado se pulverizó.

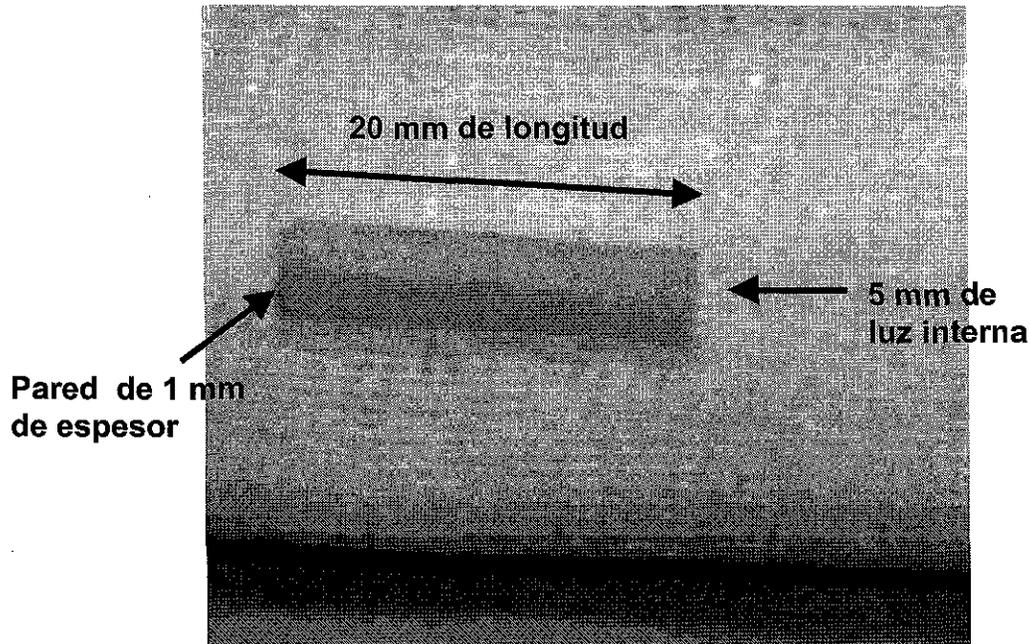
Posteriormente se utilizaron 200 g del material pulverizado y se agregaron 400 ml de hidróxido de sodio 2 M, agitándola durante 3 horas a una temperatura de 50 –70 °C para desnaturalizar y precipitar proteínas. A continuación, la mezcla se lavó en cinco ocasiones durante 20 minutos, en cada vez, con tampón tris al 0.1M con un pH de 8 después se procedió a desmineralizar la quitina digiriéndola en 200 ml de ácido clorhídrico al 1N, por espacio de 2 horas, y nuevamente la mezcla se lavó 5 veces por 20 minutos con solución tampón.

Después, la mezcla se secó durante 48 horas a una temperatura de 60 °C y el material disecado resultante se acetilizó durante 5 horas a  $100 \pm 20$  °C adicionando 400 ml de hidróxido de sodio al 2 M. Finalmente, el material se puso a secar durante 48 horas a 60 °C obteniendo un producto final de hojuelas de quitosana blancas y delgadas (Tomihata y col., 1997).

Estas hojuelas se mezclaron al 1 % mas 2 % de ácido acético con un pH 4M con agua destilada. Una vez diluida, se vaciaron en moldes de teflón y se precipitaron con una solución del 5 % de hidróxido de sodio, haciendo lavados con agua bidestilada para eliminar los restos de hidróxido y después de varias capas sobrepuestas una a una, los tubos se secaron a una temperatura de 45 a 60 °C durante 24 horas, obteniendo prótesis de aproximadamente, 20 mm de longitud por 1 mm de espesor en sus paredes y con una luz interna de 5 mm (figura 11).

Para el caso de las prótesis de los grupos tratados con esteroides al momento de diluir las hojuelas de quitosana se les agregó 50 mg de los esteroides progesterona ó pregnenolona en 10 ml de quitosana disuelta al 3 % en agua bidestilada y 1 ml de ácido acético glacial al 1 % por prótesis.

Una vez que se secaron las capas de quitosana que fueron sobrepuestas una a una, se sometieron a esterilización mediante rayos de luz ultravioleta y posteriormente se almacenaron en alcohol isopropílico y 24 horas antes de su utilización se incubaron con solución salina fisiológica.



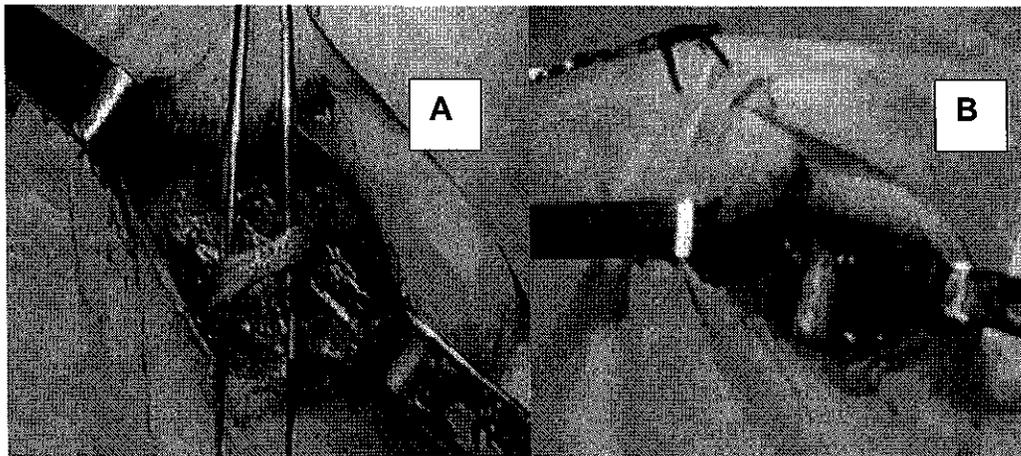
**Figura 11.** Se muestra la prótesis de quitosana utilizadas en la técnica de tubulización.

#### **Axotomía-tubulización.**

Todos los animales recibieron una inyección intramuscular de clorhidrato de promazina (25 mg / kg de peso), como medicación preanestésica, y una inyección intravenosa de pentobarbital sódico (40 mg / kg de peso) a través de la vena safena para alcanzar un plano de anestesia profundo. El animal anestesiado se colocó en decúbito lateral derecho para exponer la cara dorsal externa del muslo izquierdo, se rasuró la zona y se aplicó un antiséptico para luego practicar una incisión en la piel.

Mediante disección roma, se separaron los haces musculares, sin seccionarlos, hasta descubrir el nervio ciático, éste se liberó de sus tejidos circundantes y se seccionó un segmento de 15 mm a nivel del tercio superior del muslo. Después se sustituyó con el tubo de quitosana. Para evitar la pérdida del contenido axonal de ambos segmentos, inmediatamente después de la axotomía se insertaron 2 mm del muñón axónico proximal y distal en los extremos del tubo de quitosana de 20 mm de longitud. Los muñones del nervio se fijaron al tubo mediante dos puntos de sutura epineural con nylon 10-0 para formar, así, una cámara de crecimiento axónico de 20 mm de longitud, en cuyo interior se inyectó

solución salina al 0.9% mediante una micro-jeringa Hamilton. Las prótesis de quitosana, antes de su colocación, fueron preincubadas durante 24 hr a 37° C en solución salina al 0.9% (figura 12).



**Figura 12.** En la imagen A se observa el nervio ciático intacto indicando la zona donde se realizó la axotomía-tubulización y en la imagen B se muestra la prótesis de quitosana ya colocada una vez axotomizado el nervio.

La herida quirúrgica se reconstruyó por planos con catgut crómico 4-0 y puntos simples separados en piel con nylon 2-0. Los animales se recuperaron en un ambiente tibio antes de regresarse a sus condiciones habituales de bioterio. Al finalizar la cirugía, se aplicó una inyección intramuscular profunda de una solución de penicilina benzatínica de 800,000 UI para prevenir una infección posible y durante el periodo postoperatorio. Diariamente se realizó un examen clínico de cada animal y se practicó curación de la herida quirúrgica. Diez días después de la axotomía, se realizó la primera evaluación de la evolución de la lesión mediante observación de la capacidad de locomoción del animal y análisis de la sensibilidad de la pierna, aplicando presión en el espacio interdigital de la pata lesionada. Esta prueba se repitió cada 10 días hasta completar 60 días poslesión. A través del estudio, todos los procedimientos se realizaron bajo condiciones asépticas y siguiendo las recomendaciones del Instituto Nacional de Salud de los Estados Unidos de Norteamérica (NIH) para el manejo y la utilización de animales de laboratorio para experimentación.

### **Preparación de tejidos para análisis estructural.**

Una vez sacrificados por sobredosis de anestésico los animales que fueron axotomizados y tubulizados, se extrajeron los nervios en regeneración y una mitad longitudinal del segmento extraído fue fijada por inmersión en solución de glutaraldehído al 1 % (Sigma G 7776),

La otra mitad del segmento fue fijada en paraformaldehído al 4% (Sigma P 6148) disuelto en tampón de fosfatos 0.1 M, pH 7.4 a 4°C, durante 24 horas, con el fin de determinar la etapa y el grado de regeneración mediante la identificación específica de las estirpes celulares y componentes no celulares presentes en el proceso de reparación del nervio axotomizado, su análisis se realizó mediante microscopía electrónica de transmisión.

Para el análisis morfométrico de la citoarquitectura del nervio con microscopía de luz. a partir de cada fragmento nervioso, se obtuvieron segmentos longitudinales de 1 mm de espesor que fueron deshidratados mediante cambios en series crecientes de etanol (Sigma R 8382) y acetona (Sigma A 4206) para después ser preincluidos en mezclas de resinas epóxicas (SPI 02660 AB), 20 minutos a una proporción de 1:3, de resina y solvente (30 minutos después), los tejidos fueron sumergidos durante 1 hr en resina pura y se hizo un cambio y donde permanecen durante 12 hr a temperatura ambiente con movimientos suaves. Finalmente los tejidos se incluyeron en cápsulas Been (16659-1 Polysciences, Inc.) para después dejarlos polimerizar durante 48 hr a 60 °C. Se realizaron cortes transversales de 1 µm de espesor en un ultramicrotómo Sorvall y se tiñeron con azul de toluidina (Sigma T 70394).

Para el análisis de microscopía electrónica de transmisión, se hicieron cortes finos de 60-70 nm rango dorado a plateado de espesor en un ultramicrotómo Sorvall Se montaron 3 cortes por rejilla y 6 por animal contrastándose con una solución de acetato de uranilo y citrato de plomo, en una atmósfera saturada con NaOH para medir su precipitación. Las muestras se analizaron con un microscopio electrónico (JEOL).

**Blastotransformación linfoide (cultivo in vitro de linfocitos) para evaluar la respuesta celular.**

Se colectaron 5 ml de sangre periférica heparinizada de cada una de las hembras, se mezcló V/V con solución salina balanceada de Hanks (SSBH) a 37 °C y se centrifugó por 3 ocasiones a 1500 rpm durante 15 minutos por vez.

Posteriormente, a través de un gradiente de densidad específica, se realizó la separación de las células mononucleares a partir de la sangre que fue diluida V/V y se centrifugó con el medio de cultivo RPMI-1640 (Sigma). Estos se colocaron V/V sobre limphoprep (Nycomed) en un tubo y, posteriormente, se sometieron a centrifugación durante 30 minutos a 1500 rpm a temperatura ambiente. Las células mononucleares se obtuvieron con una pipeta pasteur de la interfase de la mezcla centrifugada y, nuevamente, las células se lavaron dos veces y se les agregó medio de cultivo RPMI-1640 (Sigma). Después se observó la viabilidad y el número de las células se determinaron utilizando el colorante de exclusión azul de tripano.

Mas tarde se sembraron 200,000 células / pozo (0.1ml) en una placa de cultivo de 96 pozos (Corning) y se les adicionó medio de cultivo RPMI-1640 (0.1 ml) suplementado con suero fetal bovino. Para determinar las células estimuladas se utilizó el mitogeno policlonal concanavalina A (Sigma) a una concentración de 0.1µg / ml hasta una llegar a una concentración final de 20 µg / ml para las células que si fueron estimuladas. Estas se incubaron a 37 °C en una atmósfera húmeda con 5 % de CO<sub>2</sub> y 1 % de O<sub>2</sub> durante 48 horas.

A todas las células se les aplicó un pulso con timidina tritiada 1 µ Ci/ Pozo con una actividad específica de 6.7 Ci / µmol; New England Nuclear, Boston MA. USA). 24 horas después se colectó con un cosechador automático (Nunc) y, finalmente, la proliferación celular se cuantificó por la medición de la incorporación de la timidina tritiada en un contador de emisiones beta (Beckman) en viales especiales para contador con 3 ml de liquido de centelleo obteniendo así las cuentas por minutos (CPM) que fueron expresadas como índices de estimulación (IE) que se obtiene de la siguiente forma:

$$IE = \frac{\text{cpm de cultivo "estimulado" con "mitogéno"}}{\text{cpm de cultivo "en medio"}}$$

Esto indicó en forma indirecta el grado de blastotransformación linfocitaria que determina si el biomaterial quitosano induce una respuesta inmunológica celular en el organismo (Morgan y col., 1995).

### **Prueba de fagocitosis con el método de adherencia al vidrio de Cunningham.**

Se montaron cubreobjetos desgrasados en medias partes en tampón de hule del número 000 con resina.

También previamente se preparó una cámara húmeda a 37 °C en la estufa de CO<sub>2</sub>. Después se obtuvo la muestra de sangre con heparina y se agregaron 150 a 200 µl de sangre desfibrinada en los cubreobjetos los cuales se colocaron en la cámara durante 40 minutos. La sangre restante se centrifugo 1500- 2000 RPM para obtener el plasma.

Se preparó un mezcla de plasma, mas un millón de levaduras de *Cándida albicans* por mililitro y 20% de SSBH + AH al 0.002% (SSBH-AH) solución salina balanceada de hanks.

Los cubreobjetos se lavaron con SSBH-AH a 37°C para eliminar las células no adheridas al cubreobjetos, e inmediatamente se agregó la mezcla al cubreobjetos para incubarlos en la cámara húmeda a 37 °C durante 20 minutos.

Después se lavaron los cubreobjetos con SSBH y se secaron a temperatura ambiental, una vez secos se tiñeron con colorante de Wright por treinta segundos, se dejaron secar y después se lavaron con agua corriente y agua destilada, finalmente se dejaron secar nuevamente y se montaron (con Entellan ®). con el portaobjeto desgrasado.

### Lectura de las placas

Para cada sujeto se contaron, en cada día de los cuatro periodos observados, 200 células de polimorfonucleares y macrófagos. En cada una de estas células se contó el número de levaduras ingeridas (vesículas teñidas de color azul intenso) que se observaban dentro del fagosoma y el número de levaduras digeridas (vesículas "fantasmas" que habían contenido levaduras que fueron digeridas).

A partir de los datos descritos anteriormente se obtuvieron las siguientes mediciones: el Índice de Fagocitosis (IF), el Índice de Ingestión (II), el Índice de Digestión (ID) y el porcentaje de Fagocitos Activos (PA). Estas medidas se definen a continuación.

$$IF = \frac{\text{número-de-levaduras"ingeridas" y "digeridas"}}{\text{número-de-células"observadas"}}$$

$$II = \frac{\text{número-de-levaduras"ingeridas"}}{\text{número-de-células"observadas"}}$$

$$ID = \frac{\text{número-de-levaduras"digeridas"}}{\text{número-de-células"observadas"}}$$

$$PA = \frac{\text{número-de-fagocitos"activos"}}{\text{número-de-células"observadas"}} \times 100$$

### **Técnica de radioinmunodifusión para la determinación cuantitativa de Inmunoglobulinas caninas.**

- 1- Se preparó una curva de calibración: agregando 10.0  $\mu$ l por orificio en las placas, de las concentraciones ya conocidas de IgM (ICN 64626) o IgG (ICN) con anticuerpos específicos dirigidos contra estas inmunoglobulinas de perro que vienen en los viales dentro del kit (aclarando que este paso es muy importante por que esta curva estándar indica la referencia de la línea recta a trazar en la hoja logarítmica).
- 2- Se agrego al mismo tiempo 10,0  $\mu$ l de cada uno de los sueros muestra previamente identificados en los orificios restantes de las placas.
- 3- Se dejaron las placas incubando durante 24 hr a temperatura ambiente en una cama húmeda.
- 4- Pasado este tiempo, con un Bernier (pie de rey) se procedió a la medición del diámetro de los anillos de los orificios que contenían las concentraciones ya conocidas de Inmunoglobulinas y de los sueros problema.
- 5- En la hoja logarítmica se registraron todos los resultados de la forma siguiente: en el eje de las Y se registraron los resultados de los sueros problemas y en el eje de las X se registraron los resultados de las concentraciones ya conocidas y con los cuales se trazo la línea recta y se procedió a graficar.
- 6- Registrados todos los datos se procedió a su interpretación (Fahey y col., 1965; Mancini, 1965).

## RESULTADOS.

Inmediatamente después del aislamiento las hembras disminuyeron su consumo de alimento y agua, además de mantener un constante ladrido. Sin embargo, ninguna presentó enfermedades aparentes durante su cautiverio y fue adecuado su consumo de comida y agua durante todo este periodo, lo que indicó que se adaptaron al aislamiento.

El primer día después de la axotomía y tubulización, a todos los animales intervenidos quirúrgicamente se les realizó asepsia de las heridas y se les colocó un cuello ortopédico para evitar que estos pudieran desgarrarse las suturas e infectarse de alguna manera las heridas. Fue evidente que el miembro lesionado de todos los animales se encontró flexionado hacia el vientre, con resistencia a extenderlo. La herida se observó inflamada y con un color rozado, esta situación prevaleció durante los primeros 5 días.

A partir del sexto día, la herida inició un proceso desinflamatorio y su aspecto se fue normalizando en todas las hembras. Los animales poco a poco fueron extendiendo el miembro lesionado y apoyándolo en el suelo, aclarando que esto no ocurrió con los animales que fueron axotomizados no tubulizados, pues continuaron con el miembro recogido hacia el vientre a pesar de que la herida estaba sanando correctamente.

Con los cuidados postoperatorios necesarios, las heridas quirúrgicas evolucionaron satisfactoriamente a los 15 días aproximadamente, y no se presentaron problemas de inflamación o de infección crónica. Por lo que a simple vista no hubo algún aviso local de rechazo de las prótesis. Todos los animales de los grupos axotomizados y tubulizados que iniciaron con una claudicación muy marcada de la pierna lesionada, progresivamente desapareció en un promedio de 20 días. Una excepción fueron las hembras del grupo control axotomizado no tubulizado, ya que 2 de las 4 hembras terminaron arrastrando el miembro por su cara dorsal hacia el suelo y las 2 restantes nunca extendieron el miembro lesionado y así continuaron con el problema hasta la finalización del estudio.

El resto de las hembras que fueron axotomizadas y tubulizadas con prótesis de quitosana, con ó sin esteroides precargados en su matriz, recuperaron la

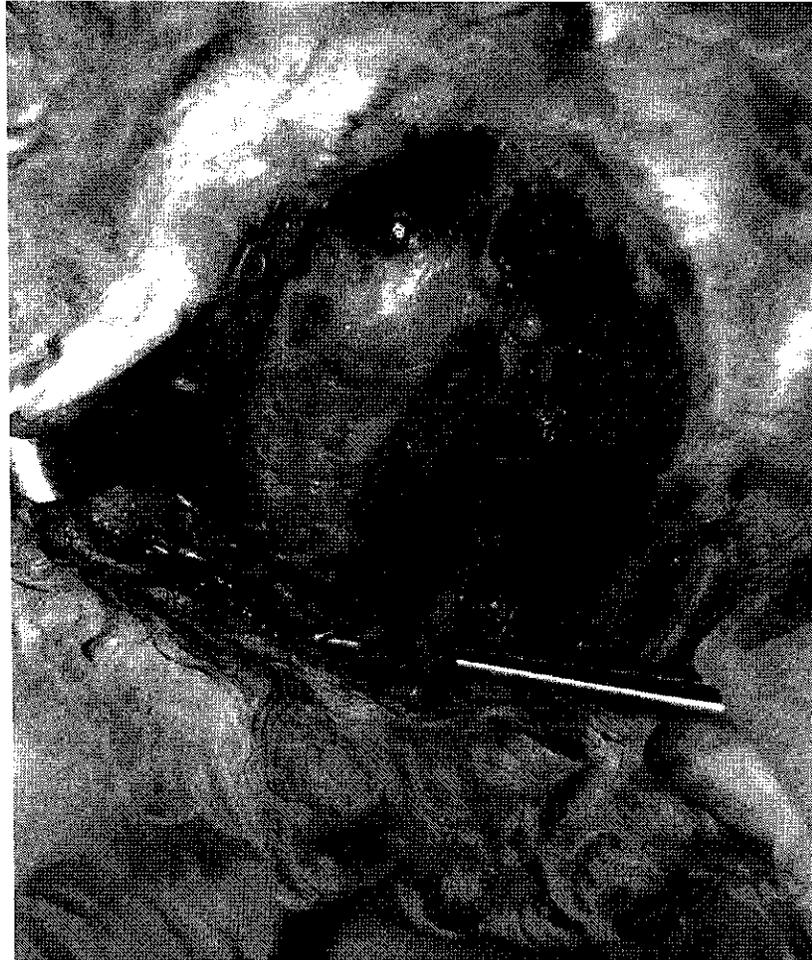
locomoción y la sensibilidad alrededor de los 30 días. Esto se comprobó al aplicarles presión en el espacio interdigital con unas pinzas de kelly observando que todas las hembras retraían el miembro al momento de la presión. Con esto se comprobó la presencia de sensibilidad del miembro ya que la fuerza con la que retraían el miembro era similar a la fuerza previa a la axotomía. Con respecto al grupo que solo fue axotomizado, su respuesta fue diferente al aplicarles la misma prueba. Se observó que no respondían y no intentaban retraer el miembro al momento de la presión. También se observó que mientras que las demás hembras se desplazaban con sus cuatro miembros y saltaban sobre sus miembros traseros, éstas se delimitaban a correr de forma lenta y torpe en tres miembros, o simplemente lo hacían arrastrando la pierna lesionada y nunca fueron capaces de sostenerse sobre sus patas traseras.

#### **Análisis macroscópico de la regeneración del nervio ciático.**

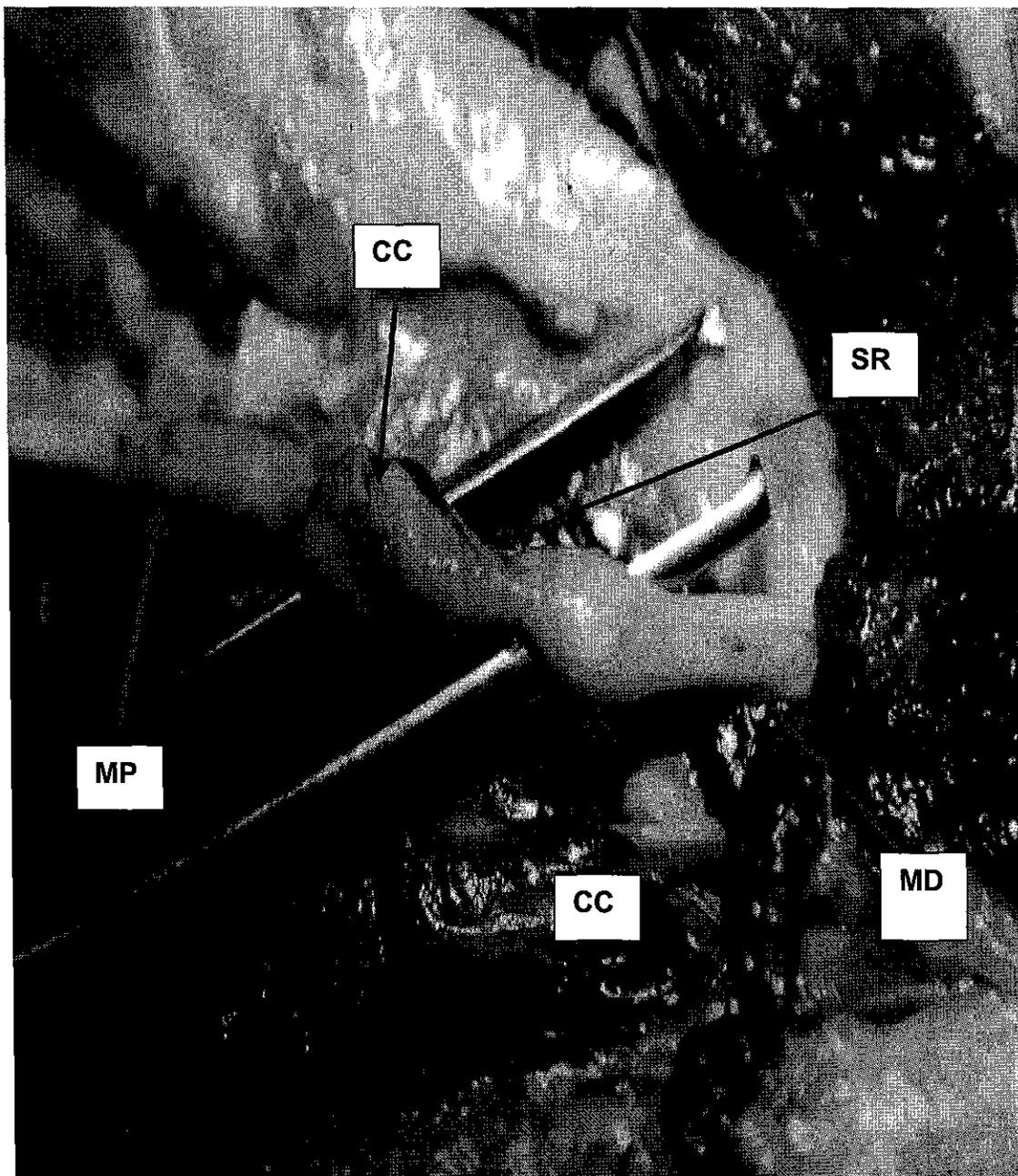
Al finalizar el tiempo programado para el estudio (60 días), se procedió el sacrificio de los animales que fueron axotomizados y tubulizados para extraerles los restos de las cámaras y observar, tanto macroscópicamente como microscópicamente, el grado de regeneración del nervio axotomizado y tubulizado. Sin embargo, al separar los músculos que cubren el nervio ciático, se observó que las prótesis desaparecieron en todos los animales y en su lugar estaban unidos los muñones proximales y distales que habían sido suturados a la prótesis y en algunos se apreciaban restos de la sutura epineural. Adjuntntos a los puntos de sutura se encontraron los conos de crecimiento. En ambos muñones se observó crecimiento normal, es decir, no hubo crecimientos por fuera de las cámaras ni tampoco se desprendieron los puntos de sutura.||||| Por el contrario, en el total de los animales axotomizados y tubulizados el crecimiento fue evidente, pues el calibre del segmento regenerado era casi idéntico en grosor y aspecto al de un nervio intacto, lo cual indicó una regeneración exitosa que se comprobó posteriormente (figuras 14-16).

Contrariamente en las hembras del grupo control que solamente fueron axotomizadas, pero no tubulizadas, se observaron los muñones de nervio que

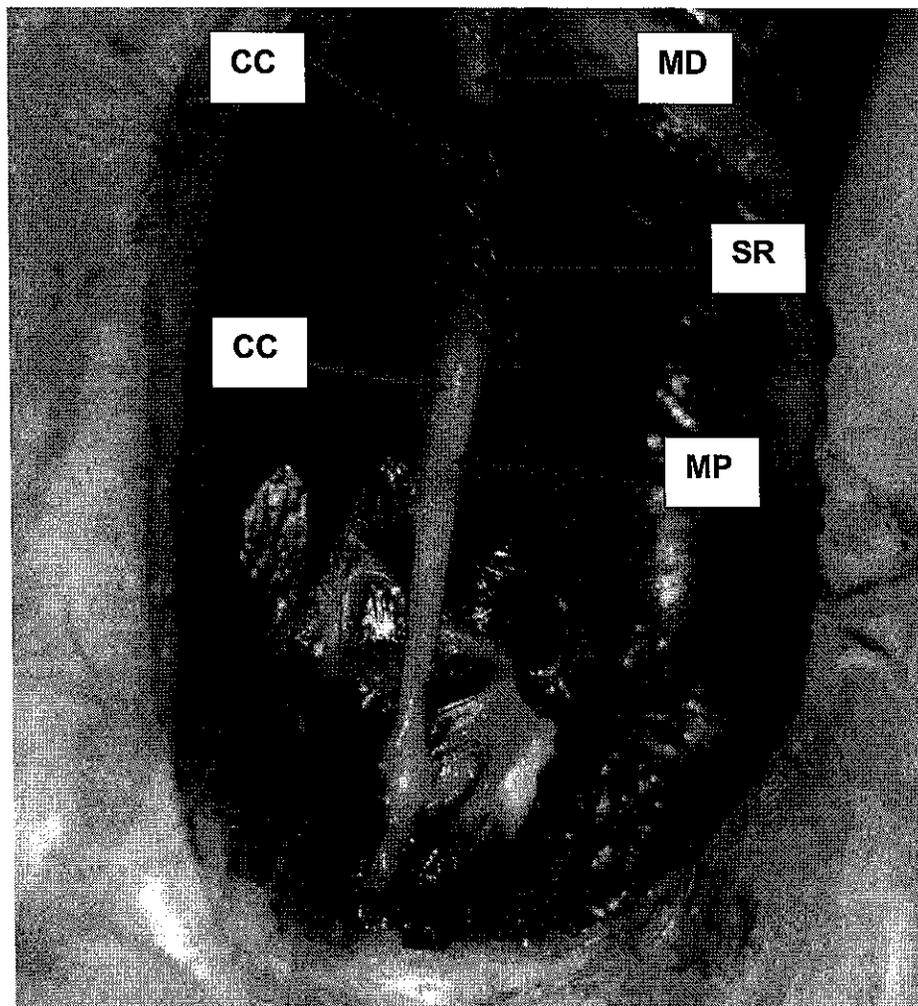
quedaron en el lugar de la lesión o sea que fueron reabsorbidos y desaparecieron por completo, es decir, en estos casos se presentó degeneración anterógrada y retrograda del muñón distal y proximal (figura 13).



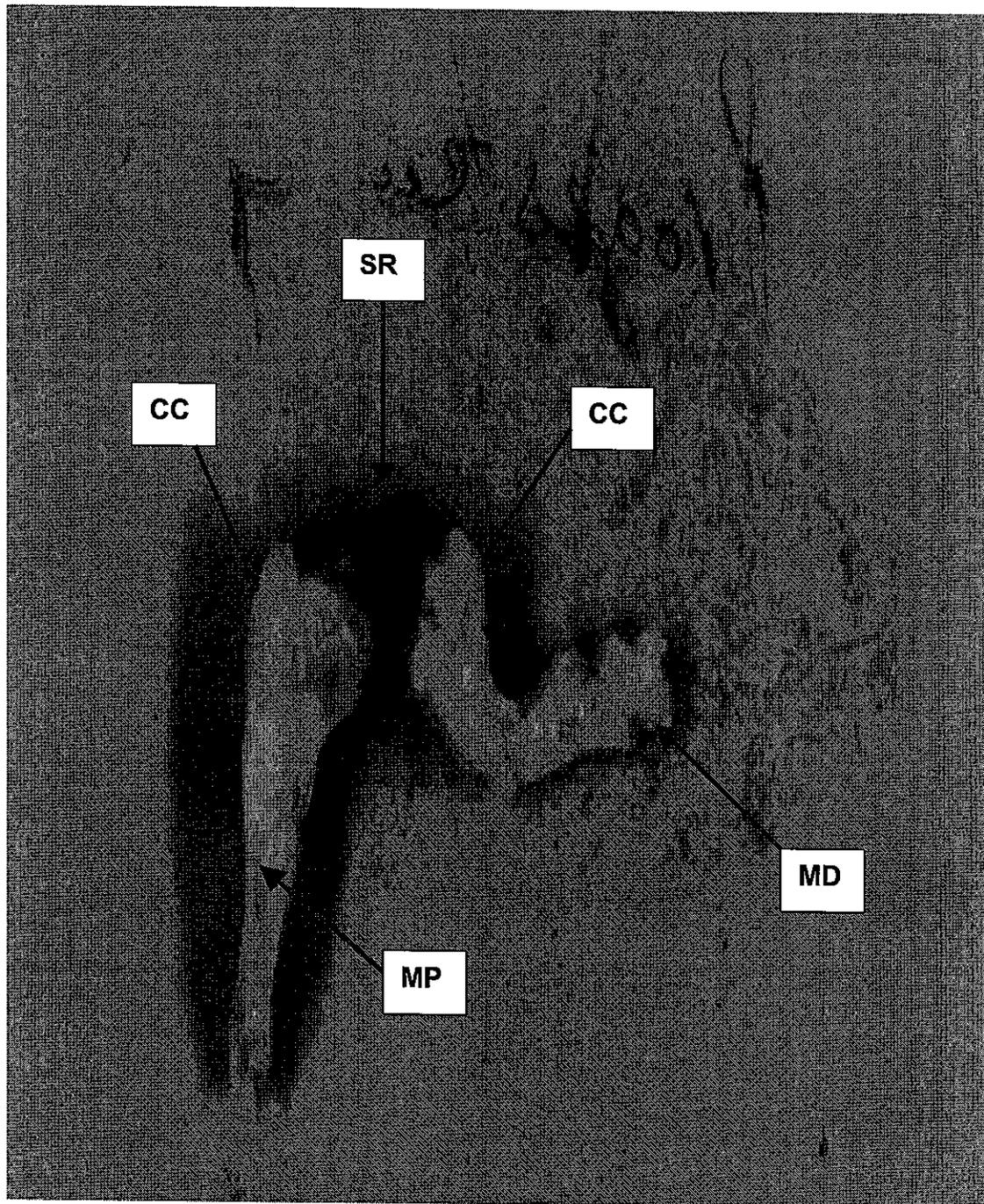
**Figura 13.** Imagen que muestra la zona en donde se encontraba el nervio ciático antes de la axotomía del grupo que fue axotomizado no tubulizado. La pinza indica su trayectoria, pero como se puede apreciar no se observaron rastros de los muñones.



**Figura 14.** Imagen muestra un nervio del grupo experimental que fue axotomizado y tubulizado con prótesis de quitosana sin neuroesteroides. Como se puede observar, se logró la regeneración en su totalidad del nervio, ya que se lograron conectar ambos muñones. Lo mismo ocurrió en todas las hembras de este grupo tampoco se encontraron restos de las cámaras, lo que demuestra que fueron degradadas por las lisosimas tisulares. Muñón distal (MD), cono de crecimiento (CC), segmento regenerado (SR) y muñón proximal (MP).



**Figura 15.** Imagen muestra el nervio de una hembra del grupo experimental que fueron axotomizadas y tubulizadas con prótesis de quitosana mezclada con progesterona. En todas las hembras se observó una regeneración casi completa del nervio. La cámara de crecimiento fue degradada por completo, pues no se encontraron restos de la mismas. Muñón distal (MD), cono de crecimiento (CC), segmento regenerado (SR) y muñón proximal (MP).



**Figura 16.** Imagen presenta un nervio del grupo que fue axotomizado y tubulizado con prótesis de quitosana y el neuroesteroide pregnenolona, precargado en sus paredes. Como se puede apreciar, al momento de separar los músculos que cubren su trayectoria no se encontraron restos de la cámara de crecimiento, solo observó que los muñones se conectaron por completo. De igual manera ocurrió con las demás hembras de este grupo. Muñón distal (MD), cono de crecimiento (CC), segmento regenerado (SR) y muñón proximal (MP).

### **Análisis con microscopía de luz del nervio en regeneración.**

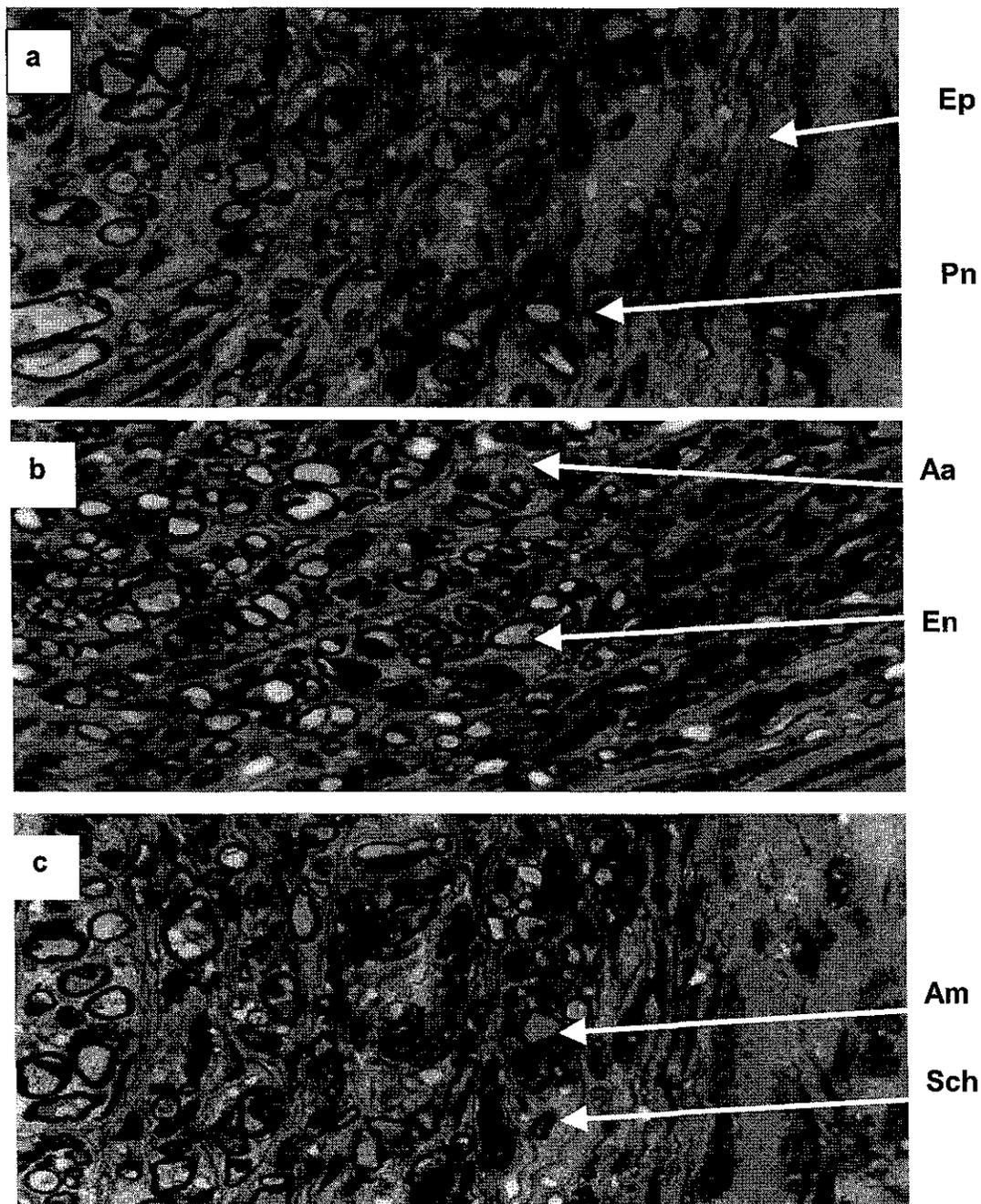
Antes de realizar microscopía electrónica era obligado cerciorarnos de una forma rápida de los aspectos de la regeneración que se produjo. El análisis con microscopía de luz permitió tener un mayor conocimiento del grado de regeneración de los crecimientos axónicos. Para esto se obtuvieron cortes transversales de 1  $\mu\text{m}$  de espesor incluidos en resinas epóxicas y teñidos con azul de toluidina. En la figura 17 se muestra un nervio control intacto donde se observa el epineuro, perineuro, endoneuro, axones no mielinizados, mielinizados y algunas células de Schwann.



**Figura 17.** Se muestra un nervio contralateral no lesionado en un corte transversal 1  $\mu\text{m}$  de espesor incluido en resinas epóxicas teñido con azul de toluidina, 100x. Se observan células de Schwann = **Sch**, **Am** = axones mielinizados, **Aa** = axones amielínicos **Pn** = perineuro, **Ep** = epineuro y **En** = endoneuro.

En los segmentos regenerados de los animales axotomizados y tubulizados con y sin esteroides, de igual manera se diferenciaron las principales zonas estructurales de un nervio normal. Se distinguió el epineuro formado de tejido conectivo laxo, el perineuro y el endoneuro con axones mielinizados y no mielinizados y numerosas células de Schwann (figura 18). En general se observaron crecimientos muy semejantes sin importar el tratamiento, ya que al comparar las imágenes con las de un nervio no lesionado se observaron los

mismos detalles demostrando un estadio regenerativo avanzado a los 60 días poslesión.



**Figura 18.** Se muestran las imágenes a, b y c que corresponden a cortes transversales de 1 $\mu$ m de espesor teñidos con azul de toluidina de nervios a los 60 días poslesión de los grupo de quitosana, progesterona y pregnenolona respectivamente y se observan células de Schwann = **Sch**, **Am** = axones mielinizados, **Aa** = axones amielinicos **Pn** = perineuro, **Ep** = epineuro y **En** = endoneuro.

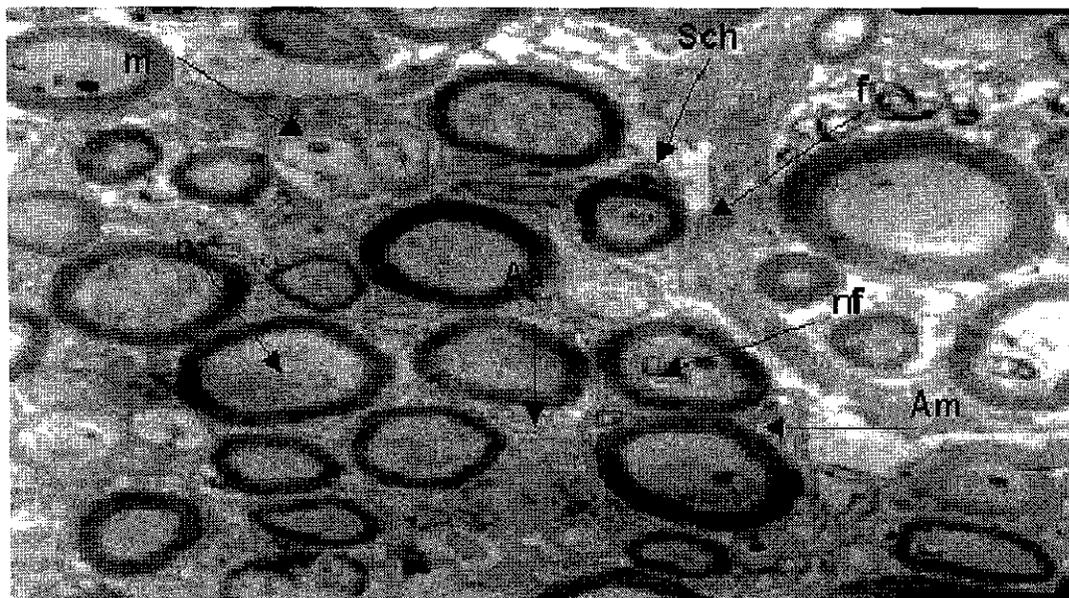
### **Análisis estructural del segmento regenerado mediante microscopia electrónica de transmisión.**

Para realizar el análisis estructural se obtuvieron negativos en película de 8.3 x 10.2 cm de campos aleatorios de una superficie por campo visual de 370  $\mu\text{m}^2$  con una superficie total de 1,850  $\mu\text{m}^2$  (5x370). El nervio contralateral no lesionado se tomó como referencia para identificar los elementos celulares y no celulares de origen nervioso o no nervioso que están presentes en el proceso de regeneración como lo son; fibras de colágena ó elastina, fibroblastos, axones mielinizados y no mielinizados en diferentes estadios de maduración.

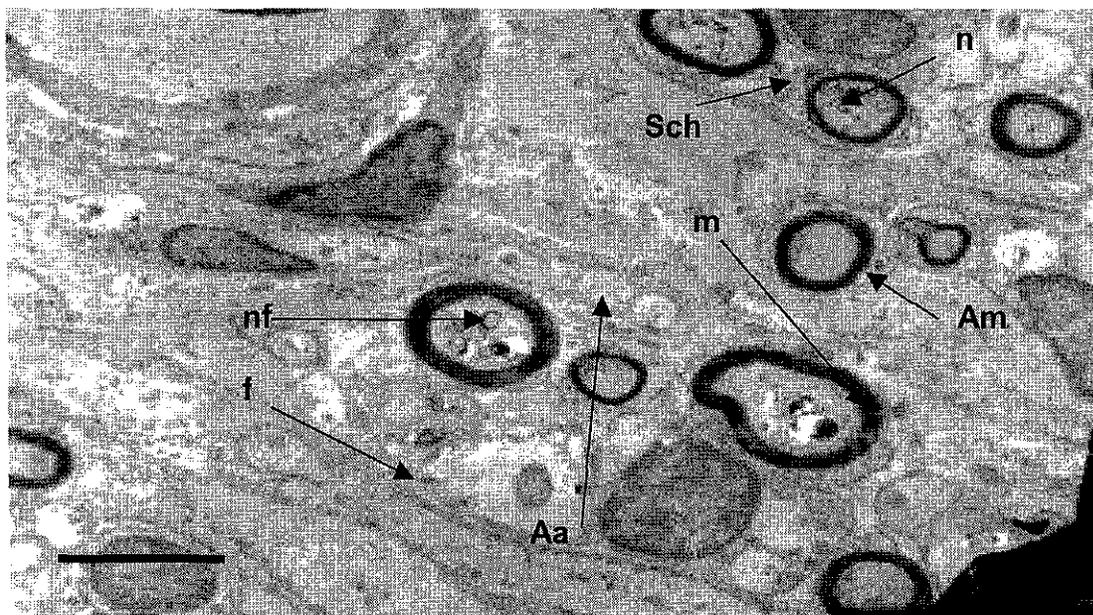
En la figura 19 se muestra una fotomicrografía de un corte transversal de un nervio intacto. Se puede observar los componentes estructurales que lo conforman; como los axones mielinizados y no mielinizados, células de Schwann, microtúbulos y neurofilamentos; estructuras que forman el andamiaje del nervio.

En los cortes transversales del grupo tubulizado con quitosana, sin esteroides, se observaron axones mielinizados y no mielinizados de diferente diámetro, células con morfología diversa y vainas de mielina con espesor variable de aspecto compacto y formas esféricas distribuidas en el corte. Así como células de Schwann en diferente grado de maduración (figura 20).

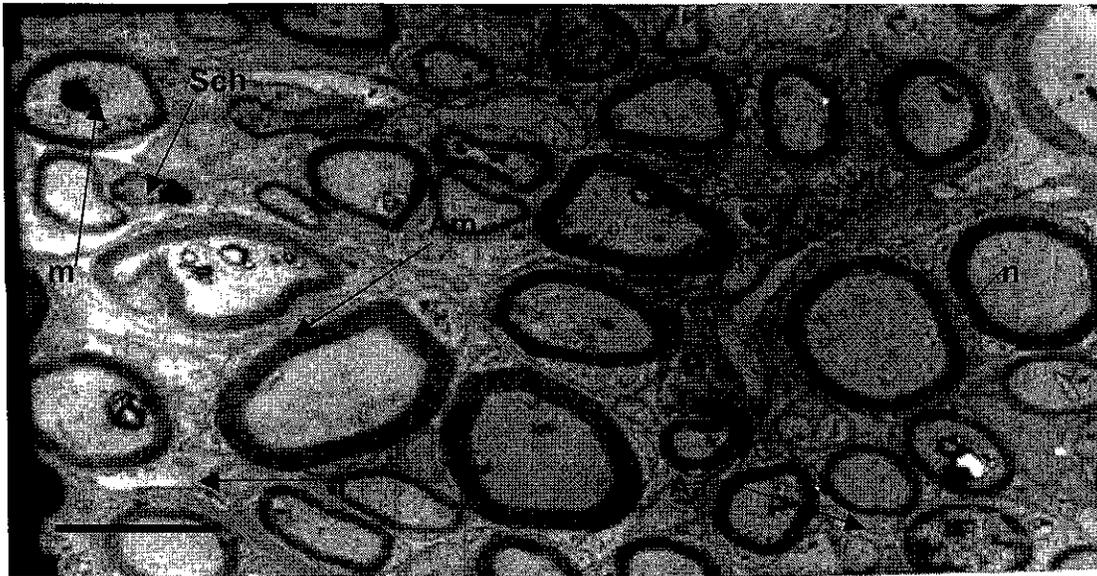
En los grupos experimentales se observó que los tratamientos con progesterona y pregnenolona tuvieron los mismos estadios de regeneración que los otros grupos. Se encontraron los espaciamentos que dividen a un nervio normal; como lo es el epineuro, perineuro y edoneuro formados por una gran cantidad de fibras de colágena elastina a manera de tejido fibroconectivo que envuelven y soportan los componentes celulares, así como a las fibras nerviosas (Figuras 21-22).



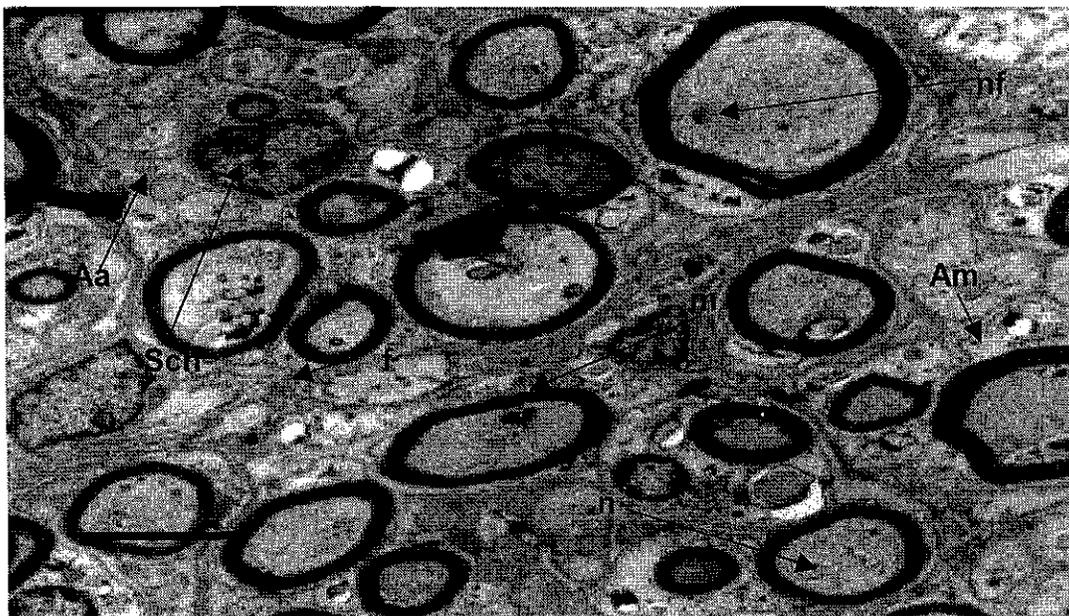
**Figura 19.** Fotomicrografía con microscopía electrónica (3,000x) de un nervio intacto contralateral no lesionado. Se observan células de Schwann = **Sch**, **nf** = neurofilamentos, **m** = mitocondrias, **Am** = axones mielinizados, **n** = neurotúbulos, **Aa** = axones amielinicos y fibrina = **f** la barra indica 2  $\mu$ m.



**Figura 20.** Fotomicrografía con microscopía electrónica (3,000x) de un nervio del grupo axotomizado y tubulizado con quitosana. Se observan células de Schwann = **Sch**, **nf** = neurofilamentos, **m** = mitocondrias, **Am** = axones mielinizados, **n** = neurotúbulos, **Aa** = axones amielinicos y fibrina = **f** la barra indica 2  $\mu$ m.



**Figura 21.** Fotomicrografía con microscopía electrónica (3,000x) del grupo experimental axotomizado y tubulizado con quitosana y el neuroesteroide progesterona. Se observan células de Schwann = **Sch**, **nf** = neurofilamentos, **m** = mitocondrias, **Am** = axones mielinizados, **n** = neurotúbulos, **Aa** = axones amielinicos y fibrina = **f** la barra indica 2  $\mu$ m.



**Figura 22.** Microfotografía con microscopía electrónica (3,000x) del grupo experimental axotomizado y tubulizado con quitosana y el neuroesteroide pregnenolona. Se observan células de Schwann = **Sch**, **nf** = neurofilamentos, **m** = mitocondrias, **Am** = axones mielinizados, **n** = neurotúbulos, **Aa** = axones amielinicos y fibrina = **f** la barra indica 2  $\mu$ m.

### **Análisis morfométrico de los segmentos proximal y distal del nervio regenerado.**

La cuantificación se llevó a cabo con el sistema automatizado QWIN 550 (LEICA) y se realizó en cortes transversales de 1  $\mu\text{m}$  de espesor incluidos en resinas epóxicas, teñidos con azul de toluidina. En todos los casos, y para fines de comparación, se tomó como control el nervio contralateral revisando en ciego 5 campos para cada animal con el objetivo de 40 x una superficie total de 14,714  $\mu\text{m}^2$  de los segmentos proximal y distal. Se determinó el número de axones mielinizados y su diámetro con la siguiente fórmula  $d = 2 (a / \pi)^{.5}$ , donde d = es el diámetro y a = el área total de la fibra). Para conocer del grado de mielinización se obtuvo la proporción "g", que refleja el grado de madurez con respecto al axón dividiendo el área total del axón mielinizado entre su axoplasma interno (área interna), que significa que a menor proporción "g" mayor superficie ocupada por mielina. Otro indicador de madurez que también se valoró en este trabajo fue el espesor de mielina.

Los datos fueron sometidos a un análisis de varianza de dos factores (Grupos x Segmentos) y se eligió un nivel de  $\alpha = 0.05$  para considerar significativas las diferencias encontradas. Para las comparaciones a posteriori se utilizó la prueba de Tukey (Morgan, 1995).

#### **Número de axones mielinizados.**

El análisis estadístico del número de axones no indicó diferencias significativas entre grupos ( $F_{3,12} = 0.35$ ,  $p = 0.787$ ) ni entre segmentos ( $F_{1,12} = 1.37$ ,  $p = 0.299$ ). Estos resultados sugieren que el número de axones mielinizados no es afectado ni por el tipo de tratamiento ni porque el registro se haga en el segmento proximal o en el distal. Como se muestra en el cuadro No 3, el grupo que tuvo mayor número de fibras mielinizadas fue el tratado con pregnenolona y para el caso del segmento distal el grupo de quitosana seguido de los grupos progesterona y pregnenolona, respectivamente, aunque con mínimas diferencias y sin alcanzar a ser significativas.

**Cuadro No 3.** Número de axones mielinizados (media  $\pm$  desviación estándar)

Grupo	Efecto entre tratamientos	Segmento proximal	Segmento distal
Control / no lesionado	72.50 $\pm$ 18.40		
Quitosana	61.87 $\pm$ 20.03	70.50 $\pm$ 19.33	53.25 $\pm$ 19.10
Progesterona	61.75 $\pm$ 24.72	69.00 $\pm$ 31.88	54.50 $\pm$ 16.42
Pregnenolona	66.87 $\pm$ 16.97	68.75 $\pm$ 14.03	65.00 $\pm$ 21.58

**Diámetro de los axones mielinizados.**

El análisis de varianza indicó que no hubo diferencias significativas en el diámetro de los axones mielinizados entre los grupos ( $F_{3,12} = 1.69$ ,  $p = 0.221$ ) y de igual forma ocurrió entre los segmentos de los diferentes grupos experimentales con relación al grupo control ( $F_{1,12} = 2.28$ ,  $p = 0.131$ ).

Los grupos que tuvieron mayor diámetro fueron pregnenolona, quitosana y de forma contraria en el segmento proximal quitosana (cuadro 4)

**Cuadro No 4.** Diámetro de los axones mielinizados en  $\mu\text{m}$  (media  $\pm$  desviación estándar).

Grupo	Efecto entre tratamientos	Segmento proximal	Segmento distal
Control / no lesionado	8.50 $\pm$ 2.43		
Quitosana	10.67 $\pm$ 2.53	11.58 $\pm$ 0.73	9.76 $\pm$ 3.49
Progesterona	8.26 $\pm$ 2.66	10.22 $\pm$ 1.29	6.30 $\pm$ 2.16
Pregnenolona	10.97 $\pm$ 2.16	11.24 $\pm$ 2.59	10.70 $\pm$ 1.99

### Proporción "g" de los axones mielinizados.

Este promedio se obtiene dividiendo el área total de la fibra entre el axoplasma interno o área Interna, e indica el grado de madurez del axón. Es inversamente proporcional al contenido de mielina, o sea que entre mayor superficie ocupada por mielina menor proporción "g". El análisis de este dato indicó que no hubo diferencias significativas entre los grupos ( $F_{3,12} = 1.17$ ,  $p = 0.362$ ), y lo mismo se observó entre los segmentos proximal y distal ( $F_{1,12} = 0.15$ ,  $p = 0.928$ ).

Sin embargo, cabe aclarar que nuevamente el grupo quitosana, seguido de pregnenolona, mostraron menor proporción, lo que demuestra que los axones de estos grupos tienen mayor espesor de mielina y por lo tanto presentan una regeneración madura y posiblemente semejante al de un nervio intacto (cuadro No 5).

**Cuadro No 5.** Proporción "g" de los axones mielinizados (media  $\pm$  desviación estándar estándar).

Grupo	Efecto entre tratamientos	Segmento proximal	Segmento distal
Control / no lesionado	0.20 $\pm$ 0.04		
Quitosana	0.22 $\pm$ 0.06	0.21 $\pm$ , 0.04	0.24 $\pm$ 0.09
Progesterona	0.26 $\pm$ 0.06	0.25 $\pm$ 0.06	0.28 $\pm$ 0.07
Pregnenolona	0.22 $\pm$ 0.06	0.19 $\pm$ 0.82	0.24 $\pm$ 0.05

### Espesor de mielina de los axones mielinizados.

El grupo experimental de quitosana, fue el que presentó menor superficie de mielina con relación al control no lesionado aunque sin diferencia significativa ( $F_{3,12} = 0.77$ ,  $p = 0.531$ ) y en los segmentos el tratamiento con pregnenolona al parecer estimulo mas la sintesis de mielina ( $F_{1,12} = 1.20$ ,  $p = 0.352$ ) (cuadro no 6).

**Cuadro No 6 .** Espesor de mielina de los axones mielinizados en  $\mu\text{m}$  (media  $\pm$  desviación estándar estándar).

Grupo	Efecto entre tratamientos	Segmento proximal	Segmento distal
Control / no lesionado	3.04 $\pm$ 0.95		
Quitosana	2.73 $\pm$ 1.20	3.14 $\pm$ 1.61	2.33 $\pm$ 0.57
Progesterona	3.18 $\pm$ 0.73	3.07 $\pm$ 0.66	3.28 $\pm$ 0.88
Pregnenolona	3.34 $\pm$ 0.76	2.96 $\pm$ 0.72	3.72 $\pm$ 0.68

**Número de axones no mielinizados de los segmentos proximal y distal.**

Los número de axones de los grupos experimentales fueron semejantes a los de un nervio intacto (como se observa en cuadro número 7) y no se encontraron diferencias significativas entre los grupos ( $F_{3,12} = 1.38$ ,  $p = 0.297$ ), ni entre los segmentos ( $F_{1,12} = 0.57$ ,  $p = 0.647$ ) y nuevamente el grupo de pregnenolona seguido de quitosana son los que tienen un mejor efecto.

Lo mismo ocurrió con el diámetro de estas fibras ya que los resultados no mostraron diferencias estadísticas entre grupos en el análisis de varianza ( $F_{3,12} = 1.69$ ,  $p = 0.223$ ) y entre segmentos ( $F_{1,12} = 2.28$ ,  $p = 0.131$ ). Aunque cabe señalar que el grupo de quitosana presentó el mayor diámetro en sus axones (cuadro número 8).

**Cuadro No 7 .** Número de axones no mielinizados (media  $\pm$  desviación estándar estándar).

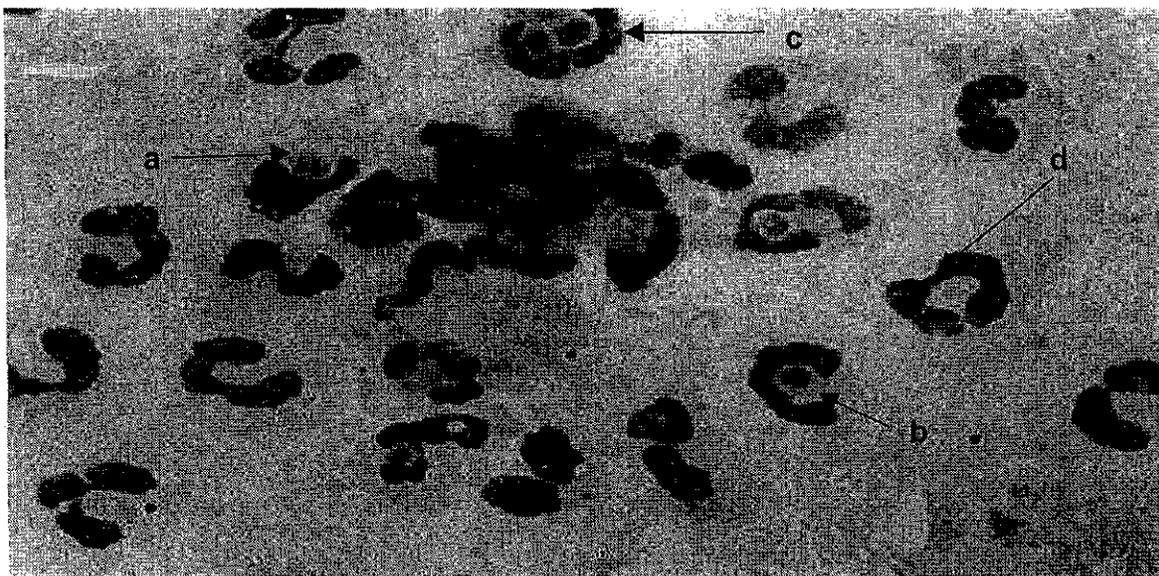
Grupo	Efecto entre tratamientos	Segmento proximal	Segmento distal
Control / no lesionado	52.75 $\pm$ 9.67		
Quitosana	62.75 $\pm$ 22.51	77.25 $\pm$ 23.15	48.25 $\pm$ 9.28
Progesterona	51.75 $\pm$ 13.60	54.00 $\pm$ 16.79	49.54 $\pm$ 11.67
Pregnenolona	63.87 $\pm$ 25.14	69.00 $\pm$ 32.92	58.75 $\pm$ 17.91

**Cuadro No 8 .** Diámetro de los axones no mielinizados en  $\mu\text{m}$  (media  $\pm$  desviación estándar).

Grupo	Efecto entre tratamientos	Proximal	Distal
Control / no lesionado	1.16 $\pm$ 0.63		
Quitosana	1.40 $\pm$ 0.50	1.11 $\pm$ 0.57	1.69 $\pm$ 0.24
Progesterona	0.77 $\pm$ 0.72	1.17 $\pm$ 0.84	0.37 $\pm$ 0.29
Pregnenolona	1.21 $\pm$ 0.87	1.53 $\pm$ 1.17	0.89 $\pm$ 0.36

### Resultados de la respuesta inmune por la presencia de las prótesis implantadas.

A partir de la sangre periférica de cada una de las hembras de los diferentes grupos, se determinó la capacidad de ingestión y de digestión de levaduras. En la figura 23 se observa una imagen de los fagocitos con levaduras ingeridas y el fagosoma como resultados de la ingestión de las mismas.

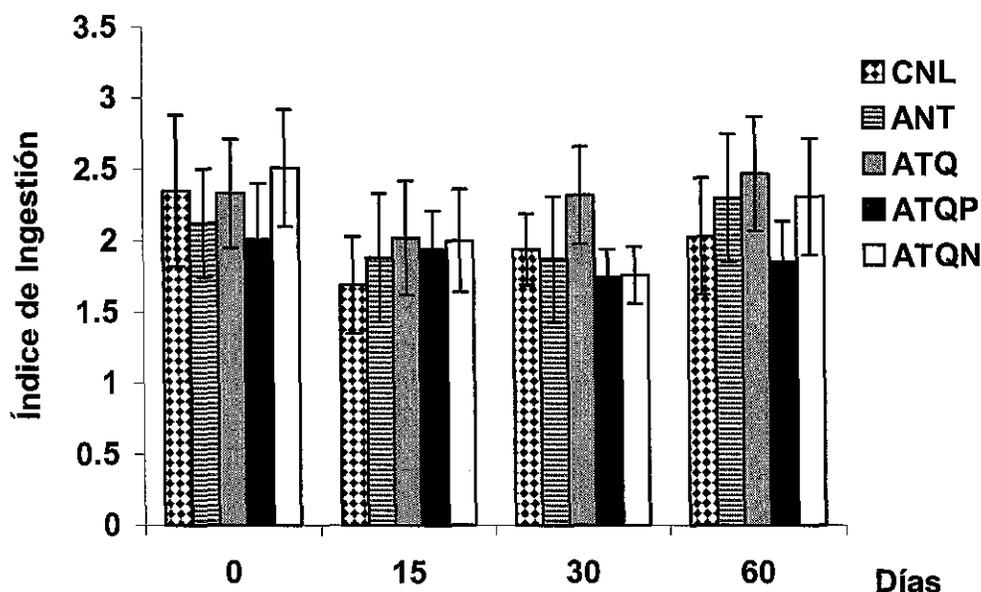


**Figura 23.** Imagen obtenida de un sujeto del grupo control, mostrando diferentes etapas de la fagocitosis, como la formación de pseudópodos que envuelven a la levadura (a), la culminación de la endocitosis (b) y la formación del fagosoma (c) que es en donde se digiere el material para finalmente dejar un fantasma celular vacío (d) 100x.

Los datos fueron sometidos a un análisis de varianza de dos factores (grupo x tiempo de evaluación) y se eligió un nivel de  $\alpha = 0.05$  para considerar significativas las diferencias encontradas. Para las comparaciones a posteriori se utilizó la prueba de Tukey (Morgan, 1995).

En lo que se refiere a la ingestión de levaduras, no existieron diferencias significativas entre los grupos ( $F_{4, 15} = 0.25$ ,  $p = 0.904$ ). Lo mismo sucedió en la interacción ( $F_{12, 45} = 0.39$ ,  $p = 0.959$ ). Estos resultados se ilustra en la (figura 24).

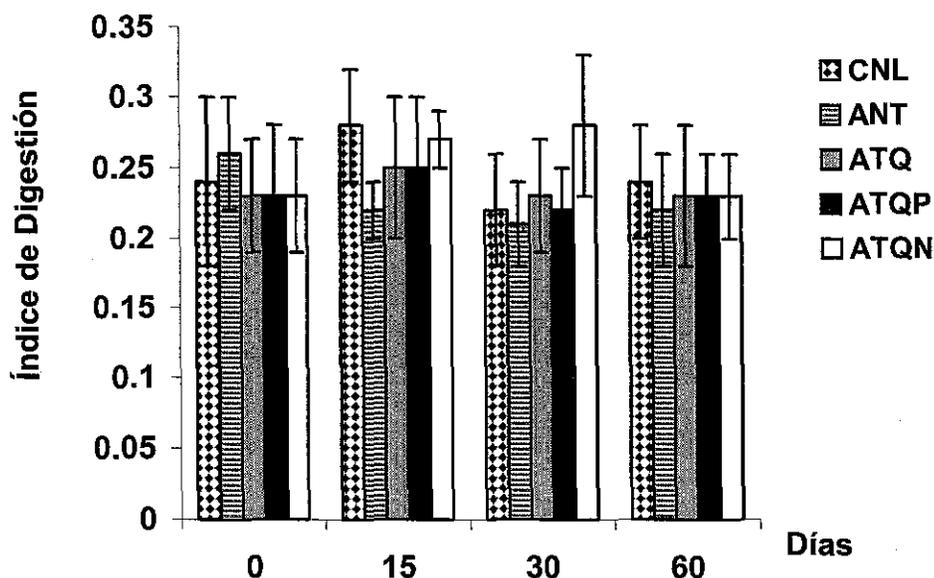
**Índice de ingestión en los grupos a través del tiempo**



**Figura 24.** Índice de ingestión en los grupos a través del tiempo. CNL = control no lesionado; ANT = axotomizado no tubulizado; ATQ = axotomizado y tubulizado con quitosana; ATQP = axotomizado y tubulizado con quitosana y progesterona; ATQN = axotomizado y tubulizado con pregnenolona (Media  $\pm$  SEM,  $n = 4$ ).

Después de que los fagocitos han ingerido, las levaduras tienen que digerirlas. El análisis de estos resultados mostró que la comparación de los cinco grupos en cuanto a la capacidad de digerir fue similar y no hubo diferencias significativas ( $F_{4,15} = 0.28$ ,  $p = 0.889$ ). Estos mismos resultados se manifestaron al comparar la interacción de los grupos a través del tiempo (figura 25) ( $F_{12, 45} = 0.18$ ,  $p = 0.998$ ).

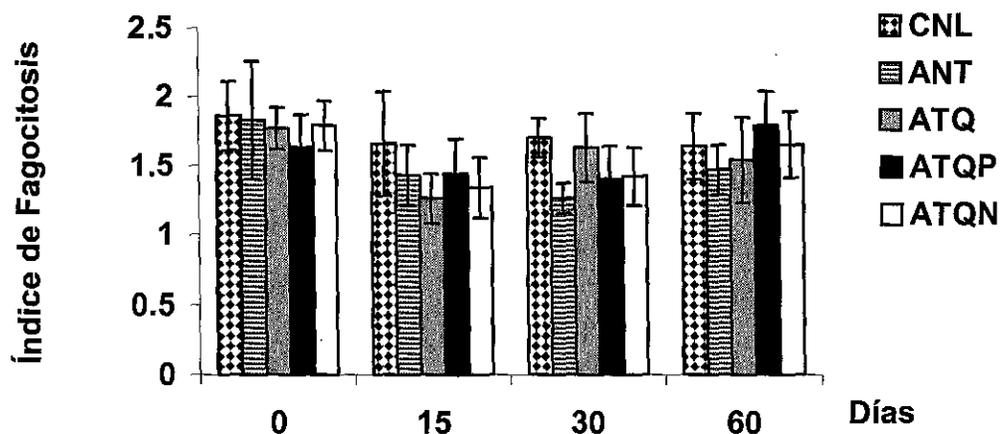
### Índice de digestión en los grupos a través del tiempo



**Figura 25.** Índice de digestión en los grupos a través del tiempo. CNL = control no lesionado; ANT = axotomizado no tubulizado; ATQ = axotomizado y tubulizado con quitosana; ATQP = axotomizado y tubulizado con quitosana y progesterona; ATQN = axotomizado y tubulizado con pregnenolona (Media  $\pm$  SEM,  $n = 4$ ).

La prueba del índice de fagocitosis demostró que no hubo diferencias significativas entre los grupos ( $F_{4,15} = 0.51$ ,  $p = 0.730$ ). De la misma manera resultó la comparación de este índice entre los grupos a través del tiempo (figura 26) ( $F_{12,45} = 0.23$ ,  $p = 0.995$ ).

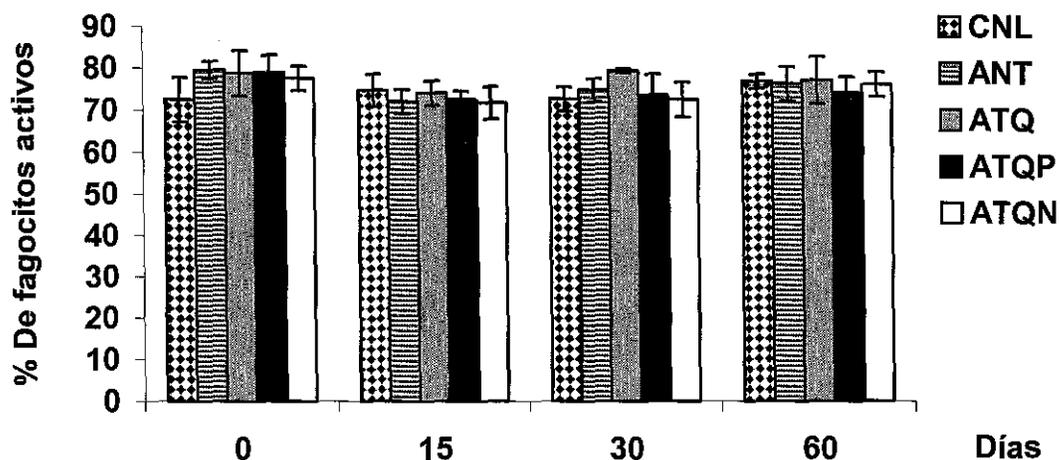
### Índice de fagocitosis en los grupos a través del tiempo



**Figura 26.** Índice de fagocitosis en los grupos a través del tiempo. CNL = control no lesionado; ANT = axotomizado no tubulizado; ATQ = axotomizado y tubulizado con quitosana; ATQP = axotomizado y tubulizado con quitosana y progesterona; ATQN = axotomizado y tubulizado con pregnenolona (Media  $\pm$  SEM, n = 4).

Una vez que se determina la capacidad de ingestión y de digestión de los fagocitos, es importante saber cual es el porcentaje del número total de fagocitos activos, para poder realizar posteriormente una discusión mas clara de los mismos resultados. El análisis de esta prueba nos indicó que no hubo diferencias entre los grupos ( $F_{4,15} = 0.38$ ,  $p = 0.819$ ), ni tampoco en la comparación de los diferentes tratamientos a través del tiempo (figura 27) ( $F_{12,45} = 0.32$ ,  $p = 0.0.981$ ).

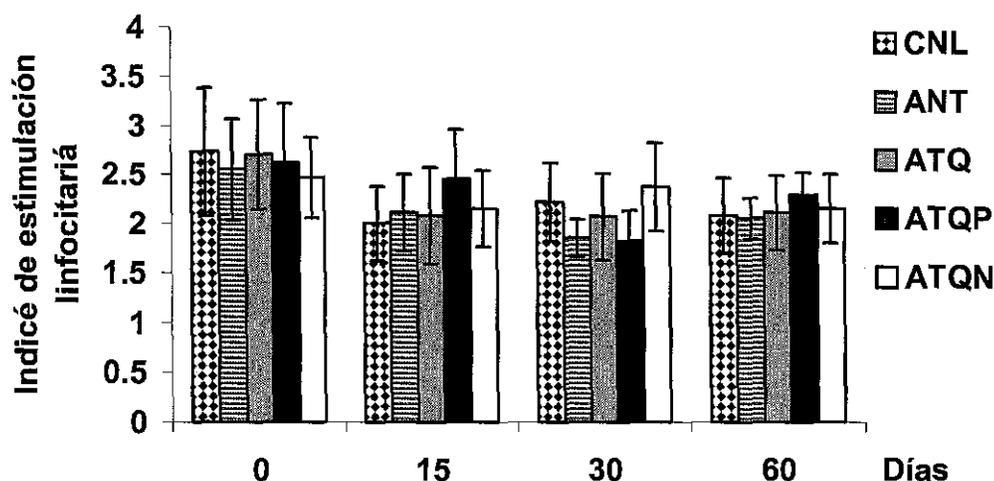
### Fagocitos activos en los grupos a través del tiempo



**Figura 27.** Comparación de los porcentajes de los fagocitos activos entre los grupos a través del tiempo. CNL = control no lesionado; ANT = axotomizado no tubulizado; ATQ = axotomizado y tubulizado con quitosana; ATQP = axotomizado y tubulizado con quitosana y progesterona; ATQN = axotomizado y tubulizado con pregnenolona (Media  $\pm$  SEM, n = 4).

El cultivo *in-vitro* de linfocitos y su análisis del grado de blastotransformación linfocitaria demostró que no hubo diferencias entre los grupos ( $F_{4,15} = 0.08$ ,  $p = 0.987$ ). Esto mismo ocurrió en la interacción de los tratamientos y el tiempo (figura 28) ( $F_{12,45} = 0.16$ ,  $p = 0.999$ ).

### Actividad linfocitaria en los grupos a través del tiempo



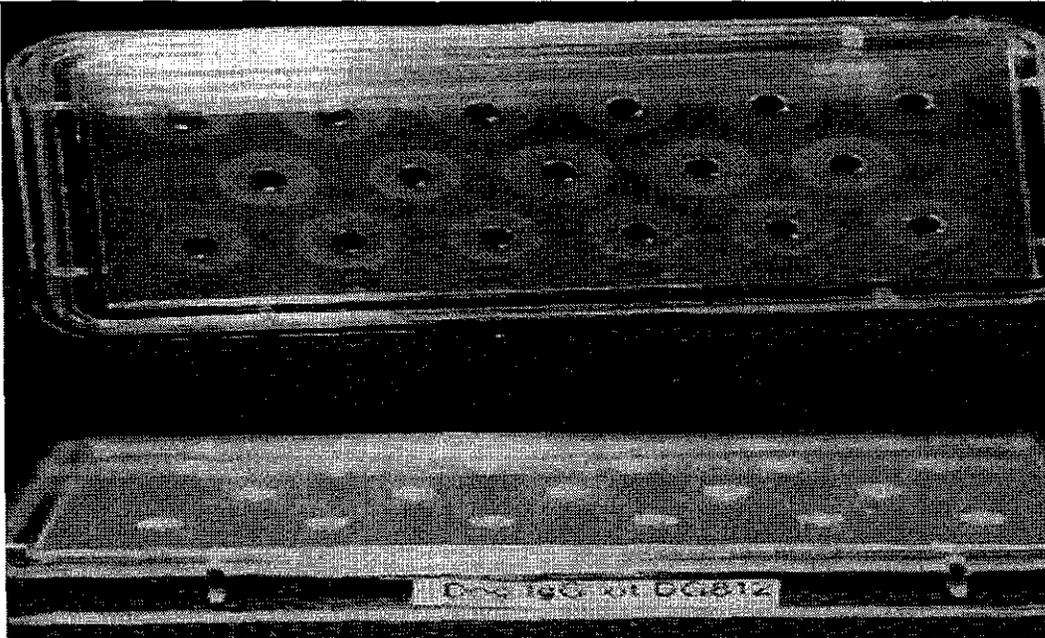
**Figura 28.** Comparación del comportamiento de la actividad linfocitaria entre los grupos a través del tiempo. CNL = control no lesionado; ANT = axotomizado no tubulizado; ATQ = axotomizado y tubulizado con quitosana; ATQP = axotomizado y tubulizado con quitosana y progesterona; ATQN = axotomizado y tubulizado con pregnenolona (Media  $\pm$  SEM, n = 4).

### Determinación de las concentraciones de las inmunoglobulinas IgG e IgM.

Las concentraciones séricas de las inmunoglobulinas fueron determinadas con base en la comparación que se realizó con concentraciones ya conocidas de las mismas y a los anillos que a su vez formaron sobre las placas. A partir de estos anillos se midieron las concentraciones de inmunoglobulinas de las hembras (figura 29).

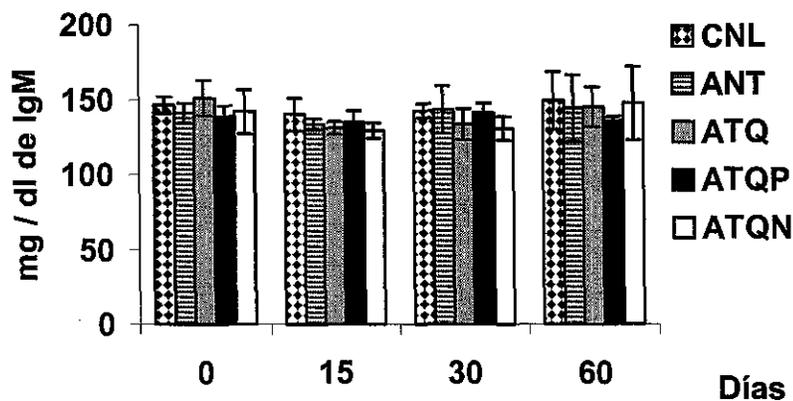
El análisis de varianza de las concentraciones de la IgM indicó que entre los grupos no hubo diferencias significativas ( $F_{4,15} = 0.55$ ,  $p = 0.705$ ).

Esto mismo se observó en la interacción de los tratamientos y el tiempo (figura 30) ( $F_{12,45} = 0.38$ ,  $p = 0.962$ ). La concentración de la inmunoglobulina IgG en sangre periférica de los animales no tuvo diferencias significativas entre los grupos ( $F_{4,15} = 0.65$ ,  $p = 0.633$ ). De manera similar ocurrió en la interacción de los tratamientos y el tiempo (figura 31) ( $F_{12,45} = 0.47$ ,  $p = 0.921$ ).



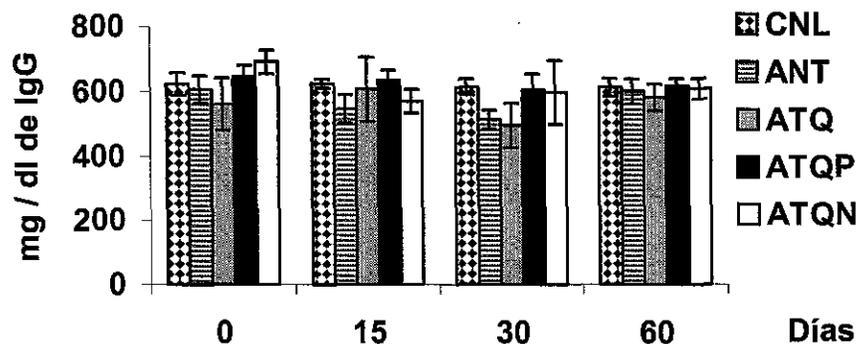
**Figura 29.** Imagen que muestra la forma como fueron determinadas las concentraciones séricas de las inmunoglobulinas en las muestras de sangre periférica de todos los animales. Los anillos representan la concentración individual para cada animal de cada grupo.

#### Concentración sérica de IgM en los grupos a través del tiempo



**Figura 30.** Comparación de la concentración de IgM entre los grupos a través del tiempo. CNL = control no lesionado; ANT = axotomizado no tubulizado; ATQ = axotomizado y tubulizado con quitosana; ATQP = axotomizado y tubulizado con quitosana y progesterona; ATQN = axotomizado y tubulizado con pregnenolona (Media  $\pm$  SEM, n = 4).

### Concentración sérica de IgG en los grupos a través del tiempo



**Figura 31.** Comparación de la concentración de IgM entre los grupos a través del tiempo. CNL = control no lesionado; ANT = axotomizado no tubulizado; ATQ = axotomizado y tubulizado con quitosana; ATQP = axotomizado y tubulizado con quitosana y progesterona; ATQN = axotomizado y tubulizado con pregnenolona (Media  $\pm$  SEM, n = 4).

## **DISCUSIÓN.**

Tomando como base resultados de trabajos previos en donde se utilizó el biomaterial quitosana en la regeneración de nervios periféricos, con o sin esteroides progenitores; como la pregnenolona, progesterona y la dehidroepiandrosterona precargados en su matriz. Se logró regenerar los nervios facial del conejo (Chávez-Delgado y col., 2001) y el ciático de la rata (Gómez-Pinedo y col., 2001). Se plantea la idea de investigar si esta prótesis, con o sin esteroides es capaz de inducir la respuesta humoral o celular del organismo.

Dado que en los últimos años el uso de este biomaterial es impresionante, lo mismo se utiliza como fibra dietética, que para fabricar campos para pelo, cremas, estabilizador de pH, vehículo de liberación prolongada etc.. Lo mas importante como referencia para este trabajo es el uso de este material en el área biomédica.

Existen una serie de antecedentes que mencionan sus propiedades fisicoquímicas en donde se describe a detalle cual es su forma de biodegradación en el organismo (Rao col., 1997)

Al mismo tiempo, progresivamente se han descrito sus propiedades inmunológicas, gracias a esto se sabe que es inerte, hipoalergénico, antifúngico, antimicrobiano compatible con neuronas y en general con el organismo (Muzzarelli y col., 1994; Yoshimoto y col., 1995).

### **Elaboración adecuada de las prótesis con o sin neuroesteroides.**

La elaboración de forma manual de las prótesis fue acorde a las necesidades del uso que se les dio, es decir la consistencia, permeabilidad y elasticidad de cada una de las cámaras de crecimiento fueron elementos importantes que se cuidaron. Al colocarlas entre ambos muñones y suturarlas al epineuro, estas tuvieron que soportar la presión de retracción que aplicaron los muñones al mover la pierna del animal.

La permeabilidad de las mismas permitió liberar por difusión y de forma constante y gradual los esteroides que fueron precargados en su matriz (Felt y col., 1998; Jamela y col., 1995,1998; Chávez-Delgado y col., 2002).

La intención de la técnica de tubulización, fue la de utilizar una prótesis en forma de tubo que reorientara el rebrote axónico en la reparación de lesiones de nervios periféricos con pérdida de un segmento. Con silicona se han producido buenos resultados, inclusive cuando se ha aplicado en la reparación de nervios humanos (Lundborg y col., 1994). Sin embargo, la silicona no es absorbible, por lo que se necesita una segunda cirugía para retirarla (Saintigny y col., 1993). En comparación con la silicona, la quitosana ofrece las ventajas de permitir la liberación local y prolongada de compuestos al actuar como vehículo, evita los efectos colaterales indeseables de un tratamiento sistémico y, además, con el paso del tiempo desaparece al ser degradada por lisosimas tisulares ((Kas y col., 1997; Rao col., 1997; Jamela y col ., 1995, 1998).

Por otro lado, recientemente se publicaron trabajos en donde se demostró la gran afinidad de la quitosana con las células nerviosas, esto al utilizarla como vehículo de liberación prolongada al ser mezclada con substancias que crean un adecuado microambiente para la regeneración nerviosa (Haipeng y col., 2000).

### **El análisis macroscópico de los restos de las cámaras y el nervio en regeneración.**

Las animales no manifestaron signos de rechazo ni de inflamación local como respuesta al implante. Cuando se sacrificaron los animales y se separaron los músculos que cubrían al nervio ciático, se esperaba encontrar restos de las cámaras colocadas entre los muñones cubiertas de tejido fibroconectivo. En su lugar solo se encontraron los nervios casi completamente regenerados y en solo dos animales pequeños fragmentos de las cámaras. esto indica una avanzada biodegradación de las prótesis a los 60 días después de la axotomía-tubulización y la regeneración casi completa de los nervios axotomizados y tubulizados con quitosana, con o sin esteroides, como ya antes se había reportado (Gómez-Pinedo y col., 2001; Chávez-Delgado y col., 2001). El calibre y grosor fueron casi semejantes a los de un nervio intacto.

Con esto se comprueba la biodegradación y absorción de la quitosana por parte del organismo, así como la ausencia de una respuesta indeseable local o

sistémica (Kanje y col., 1988), ya que no se observaron manifestaciones de rechazo y fue bien tolerada la prótesis por el organismo al utilizarla como prótesis.

### **Análisis con microscopia de luz.**

Con base en los hallazgos macroscópicos, la regeneración se llevó desde el cono de crecimiento proximal hacia el distal y se observó con claridad que los nervios se habían regenerado y que estos se conectaron uno con otro evitando que se presentara degeneración Walleriana por falta de soporte neurotrófico. Los cortes evaluados revelaron que, sin importar el tratamiento, el uso de la quitosana logró la regeneración de un segmento de 15 mm del nervio ciático del perro, cuyo calibre y morfología es semejante al del humano. Se observaron células de Schwann con diferente grado de maduración, axones mielinizados y no mielinizados.

El estadio de regeneración en todos los animales fue muy maduro y evidente. Esto se constató mediante el análisis de la citoarquitectura de los nervios tubulizados la cual resultó semejante a la de un nervio intacto. Esto comprobó que el uso de este biomaterial ofreció mejores resultados que los materiales sintéticos y que otros biomateriales que se han sido descritos anteriormente (Spector y col., 1991ab; 1992; 1993; Suzuki y col., 1999, 2000).

### **Análisis con microscopia electrónica de transmisión.**

La regeneración mediante la tubulización inicia con la concentración de líquido acelular en la cámara axónica (Brian y col., 1991) y están presentes suero, sangre, líquido extracelular y detritus citoplasmáticos, incluyendo organelos intracitoplasmáticos provenientes de los segmentos nerviosos proximal y distal (Spector y col., 1991ab). Adicionalmente están presentes factores neurotróficos y promotores de neuritas con efectos sobre el crecimiento y migración celular, mitogénesis y elongación de neuritas crecimiento axonal y mielinización (Varón y col., 1993; Ide., 1997; Williams y col., 1987). Estadios en los que intervienen factores humorales y celulares para regenerar los nervios axotomizados (Den Dunnen y col., 1996, 2000)

Trabajos previos de Chávez Delgado (2001) y de Gómez-Pinedo (2001), orientaron su estudio a analizar con detalle los primeros estadios de la regeneración en nervios periféricos seccionados y reparados mediante tubulización con quitosana pura o mezclada con los esteroides pregnenolona, progesterona y dehidroepiandrosterona.

Las estirpes celulares reportados en estos estudios, de acuerdo a su morfología, al interior de las cámaras y en los segmentos en regeneración fueron: eosinofilos, neutrofilos y células plasmáticas durante los primeros 15 días; que desaparecen alrededor de los 45 días posaxotomía-tubulización.

Después de los 45 días encontraron macrófagos; que está reportado que sintetizan factores de crecimiento como NGF, FGF (Den Dunnen y col., 1996), fibroblastos; que forman un andamiaje trabecular entre ambos muñones, vasos sanguíneos funcionales y en formación hasta que desaparecen las células regeneradoras mesodérmicas iniciadoras y aparece la última etapa (Spector y col., 1992). Precisamente en esta etapa es donde el presente trabajo intenta retomar el proceso de regeneración del nervio ciático mediante tubulización por la razón de no existir trabajos que lo describen.

Mediante microscopía electrónica de los segmentos proximales y distales regenerados de los animales que fueron axotomizados y tubulizados con quitosana, con o sin neuroesteroides, fue posible detectar a las células de Schwann; que se ha reportado que envuelven el axón para proveerlo de mielina (Dumitru y col., 1994), axones no mielinizados y en proceso de mielinización (rodeados por células de Schwann); como lo reporto Spector y col. (1991ab).

También se observó que los nervios se agruparon en fascículos separados por estructuras de colágena, elastina y fibrina, estructuras precursoras del epineuro, perineuro y endoneuro; tal y como lo describen Dumitru y col. (1994); Ganong y col. (1997).

En este periodo se alcanzó una organización fascicular definitiva y el perineuro rodeó grupos de axones que continuaron su proceso de maduración hasta alcanzar una reorganización; como fue reportado por Brian y col. (1991) Spector y col. (1991ab) y Varón y col. (1993).

En trabajos previos donde se ha utilizado el polímero poli-lactato M carprolactona, utilizado para reparar el nervio ciático de la rata, se menciona que a los 22 días se observan fibras mielinizadas, y a los dos años los nervios regenerados fueron semejantes a un nervio normal (den Dunn y col., 1996, 2000).

En el presente trabajo a los 45 y 30 días fue posible observar las fibras mielinizadas, además de proporciones "g" muy bajas de las fibras nerviosas, lo cual fue descrito en los estudios de Chávez- Delgado y col. (2001) y Gómez-Pinedo y col. (2001).

### **Análisis morfométrico de los nervios regenerados.**

El número de fibras mielinizadas para todos los casos, a los 60 días, fue similar en los grupos experimentales con relación a un nervio intacto. No hubo diferencias significativas al comparar muñones de ambos grupos y la presencia de los esteroides, al parecer no tuvo efecto alguno. Aunque fue notorio que los grupos con esteroides, presentaron un mayor número de axones en el muñón proximal indicando que el tratamiento con ellos evitó la degeneración Walleriana y al mantener la prótesis la comunicación química (soporte neurotrófico) ayudo a mantener un medio ambiente adecuado para la regeneración.

El diámetro de los axones mielinizados evidenció diferencias significativas al comparar ambos muñones, pues como se observó en los grupos tubulizados, presentaron un mayor diámetro en el segmento regenerado proximal que el distal del grupo quitosana con progesterona que los de quitosana y pregnenolona.

En relación al espesor de mielina, el grupo tubulizado con quitosana presentó un mayor espesor en sus axones, aunque no de manera significativa.

También se presentó un nulo efecto de los esteroides a pesar de que se ha reportado que la progesterona es sintetizada por las células de Schwann a partir de la pregnenolona con el propósito de que estas produzcan factores neurotróficos e induzcan la remielinización (Koenig y col., 1995; 2000; Baulieu y col., 2000).

O tal vez estimulen directamente la síntesis de mielina de manera autocrina (Baulieu y col., 2000), inclusive puede ser captada por los receptores específicos de progesterona en las células de Schwann activando los genes específicos de

proteínas de mielina (PO y PMP22) necesarias en la síntesis de mielina (Garbay y col., 2000).

Aunque no hay receptores específicos para la pregnenolona en las células de Schwann, ha sido detectada en nervios periféricos de humanos y en el nervio ciático del ratón (Koenig y col., 1995; 2000; Baulieu y col., 2000).

Con relación al número de axones no mielinizados y su diámetro, en el presente estudio no se encontraron diferencias entre los tratamientos y en ambos segmentos analizados, lo que nos indica una regeneración muy completa y madura a los 60 días en un defecto de 15 mm.

### **Pruebas inmunológicas.**

Las características fisicoquímicas de los biomateriales y su capacidad para actuar como un antígeno junto con la capacidad del organismo de reconocer lo propio de lo ajeno, determinan la respuesta del organismo para formar anticuerpos específicos. Esta respuesta dependerá de las condiciones propias del organismo y de si éste tuvo con anterioridad contacto con el material y sus antígenos (Mateos-Rodríguez y col., 1998; Anderson, 1988).

Para el caso de materiales no biodegradables, la respuesta inflamatoria es importante porque esta aumenta por estar en contacto directo con los tejidos y muchas de las veces son encapsulados por tejido fibroconectivo (Hadlock y col., 2000). Se sabe que la quitosana produce ligeras reacciones inflamatorias por su baja citotoxicidad y por ser hipoalergénica (Muzzarelli y col., 1994; Yoshimoto y col., 1995).

También se reporta que la quitosana reduce la atracción tisular al desacetilizarla, disminuyendo de esta manera la reacción inflamatoria, esto se debe a que en su estructura química contiene el potencial "zeta" dado por las aminas catiónicas que la vuelve inerte (Felt y col., 1998; Hadlock y col., 2000)

En lo que se refiere al aspecto inmunológico, y los resultados obtenidos de la comparación de la capacidad de ingestión de levaduras por parte de los PMN fue muy similar entre los grupos, lo que indica que la presencia de la prótesis de quitosana, con o sin esteroides, no tuvo efecto significativo en la respuesta inmune

inespecífica durante todo el estudio en los diferentes grupos. A los 15 días postaislamiento y postraumatismo quirúrgico fue notorio una ligera disminución de los índices de ingestión por parte de los fagocitos. Sin embargo, la comparación entre grupos no arrojó diferencias significativas, la disminución de fagocitocis en los periodos de postaislamiento y postraumatismo también se manifestó con la disminución de su capacidad de digestión.

En cuanto al porcentaje de fagocitos activos se observa un notablemente incremento en el grupo tubulizado con prótesis de quitosana datos que concuerdan con los resultados de (Ozmeric y col., 2000) respecto a que la quitosana tiene la capacidad de atracción de macrófagos. A través del tiempo no se presentaron diferencias significativas, lo que nos indica nuevamente que las prótesis no estimularon la respuesta inmune de rechazo.

El índice de blastotransformación linfocitaria no se observó alterado significativamente, el número de linfocitos estimulados con concanavalina A ante la presencia de quitosana con o sin neuroesteroides disminuyen ligeramente en los grupos experimentales, así como en los controles, demostrando que el estrés y el aislamiento individual eran los causantes de esta baja, corroborando, lo que ya se había reportado en trabajos previos en donde mencionan que la quitosana era hipoalérgica y compatible con el organismo (Muzzarelli y col., 1994; Yoshimoto y col., 1995).

Con base en los resultados mostrados podemos decir que el comportamiento de la respuesta inmune que siguieron los grupos fue semejante, la presencia de las prótesis de quitosana con o sin neuroesteroides no se refleja como inmunoestimulante o inmunodepresora de la respuesta celular.

Sin embargo, como se observa en las figuras, la ligera disminución que se presentó en las dos últimos periodos se deba quizás al traumatismo posquirúrgico o al estrés por aislamiento al que fueron sometidos los animales.

En el caso de las concentraciones de la inmunoglobulina M y G, que son las que serían aumentadas o disminuidas de acuerdo a la respuesta humoral del organismo ante la presencia de los esteroides y la quitosana, observamos que ambas inmunoglobulinas se mantuvieron estables en los cinco grupos y durante el

periodo de estudio. Este resultado nos sugiere que no se alteró la respuesta humoral en los animales por la presencia de los esteroides o del biomaterial quitosana y tampoco por el efecto del estrés causado por aislamiento o por traumatismo quirúrgico o simplemente.

## **CONCLUSIONES.**

- 1-. La liberación prolongada de los neuroesteroides por parte de las cámaras de crecimiento permitió un tratamiento local sobre el nervio lesionado y el análisis morfométrico demostro que la regeneración de los nervios axotomizados y tubulizados se logró independientemente del tratamiento.
- 2-. El muñón distal de los animales axotomizados y tubulizados no presentó degeneración Walleriana.
- 3-. La quitosana utilizada al 3 % por cada 10 ml para fabricar una prótesis con y sin esteroides precargados y tubulizar el nervio ciático axotomizado para inducir su regeneración no alteró los parámetros de la respuesta inmune humoral y celular del organismo (índice de ingestión, índice de digestión, índice de defagocitosis, porcentajede fagocitos activos, índice de linfoproliferación y niveles séricos de IgM e IgG).
- 4-. Basados en los resultados de las pruebas de cultivo in vitro de linfocitos, fagocitosis y la concentración de inmunoglobulinas las prótesis de quitosana, con o sin esteroides, no manifestaron señales de rechazo local, clínico o histológico por parte del organismo y la cámara de tubulización fue degradada y absorbida prácticamente en su totalidad por el organismo a los 60 días postubulización.

## **Recomendaciones.**

Por sus propiedades físicas y químicas, la quitosana, se puede contemplar como una buena alternativa para elaborar prótesis para tubulizar nervios periféricos seccionados.

## **Limitaciones del estudio:**

Aunque se logró regenerar el segmento de nervio seccionado hace falta demostrar si la conducción del impulso y la recuperación de placa neuromotriz del nervio regenerado es semejante al de un nervio intacto.

**BIBLIOGRAFÍA.**

- Anderson M.** Inflammatory response to implants. *ASAIO Trans.* 1988; 11: 101-107.
- Aguado A., David S., Richardson P., Bray G.** Axonal elongation in peripheral and central nervous system transplants. *Adv. Cell. Neurobiol.* 1982; 3: 215.
- Acikigoz M., Kas H. S., Hascellk Z., Mliii U., Hincal A.** Collagen an is interaction with chitosan Influence of the phsicochemical characteristics *Collagen Pharmazie.* 1995; 50: 275-7.
- Bailey S., Eichler M., Villadiego A., Rich K.** The influence of fibronectin and laminin during Schwann cell migration and peripheral nerve regeneration through silicon chambers. *J. Neurocytol.* 1993; 22: 176.
- Barnes A., Bee A., Suee Bou.** Immunological and inflammatory characterization of the canine cell unes Ki, K6 and DH82. *Veternary Immunology and Immunopathology.* 2000; 30: 9-25.
- Bates D., Ranford J., Mánoelsodorf D.** Blot and culture analysis of neuronotrophic factors in nerve regeneration chamber fluids. *Neurochem. Res.* 1991; 16: 621.
- Baulieu E., Schumacher M.** Neurosteroids, with special reference to the effect of progesterone of myelination in peripheral nerves. *Mult. Scler.* 1997; 3: 105.
- Baulieu E., Schumacher M.** Progesterone as neuroactive neurosteroid with special reference to the effect of progesterone on myelination. *Steroid.* 2000; 1: 11-13.
- Braun R., M.** Comparative studies of neurorrhaphy and suture less peripheral nerve repair. *Surg. Gynecot. Obstet.* 1966; 122: 15-18.
- Brian J. F., M. D., Mattox O. E., M. O.** Experimental nerve regeneration. A review. in: *Otolaryngoscope Clin. North. Am.* Department of Otolaryngoscope, Head and Neck Surgery. University of California, Irvine. 1991; 24: (3), 739-52.
- Bridge P., Bali D., Mackinnon S., Nakao Y., Brandt K., Hunter D., Hertl C.** Nerve crush injuries. A model for axonotmesis. *Exp. Neurol.* 1994; 127: 284.
- Byrne K. M., Kim H. w., Chew B. P., Reinhart G. A., Haye K. M. G.** Standarized gating technique for the generation of flow cytometry data for normal canine and

normal feline blood lymphocytes. *Veterinary Immunology. Immunopathol.* 2000; 73: 167-182.

**Campbell J. B., Bassett C. A., Husby J., Thulin C. A., Feringa E. R.** Microfilter sheaths in peripheral nerve surgery. *J. Trauma.* 1961; 1: 139-157.

**Chávez-Delgado E.** Quitosana prótesis nerviosas y vehículo de esteroides en la regeneración del nervio facial de conejo. *Análisis Ultraestructural. An, ORL-Mex.,* 2001; 46 (4): 128-139.

**Chaudhry y., Giass J., Friffin J.** Wallerian degeneration in peripheral nerve disease. In *Neurologic Clinics. Peripheral Neuropathy: New concepts and treatments.* Baltimore Maryland. 1992; 10 (3): 613.

**Chen Y., Wang-Bennett L., Coker N.** Facial Nerve regeneration in the silicone chamber: The influence of Nerve Growth Factor. *Exp. Neurosci.* 1989; 103: 52.

**Chongliang H., Zhongwei C., Zhengrong C.** Enhancement of motor nerve regeneration by nerve growth factor. *Microsurgery.* 1992; 13: 151.

**Danielsen N.** Nerve regeneration and repair. *Diabetic Medicine.* 1996; 13: 677.

**Danieisen N., Pettman H. L., Vahlsing M., Varon S.** Fibroblast growth factor effects on peripheral nerve regeneration in silicone chamber model. *J. Neurosci. Res.* 1988; 20: 320.

**Davis G., Varon S., Engvall E., Manthorpe M.** Substratum-binding neurite-promoting factors: relations hips to laminin. *Trends. Neurosci.* 1985; 8: 528.

**Den dunnen W. F., Stokros I Blaauw E H., Holowerda A., Penings A., J. Robinson P., H. et al.** Light-microscopic and electron- microscopic evaluation of short-tem nerve regeneration using a biodegradable poly (DL-lactide-M caprolacton) nerve guide. *J. Biomed. Mater. Res.* 1996; 31: 105-115.

**den dunnen W., F. Meek M., F. Grijpma D., W. Robinson P., H. Schakenraad J., M.** In vivo and in vitro degradation of poly (50)/(59)(85)/(15)(L)/ (D) LA/epsilon-CL, and the implication for the use in nerve reconstruction. *J. Biomed Mater. Res.* 2000; 51: 575-585.

**Désarnaud F., Thi Do, Brown A., Lemke G., Suter U., Baulieu E., Schumacher M.** Progesterone stimulates the activity of the promoters of peripheral myelin protein-22 and protein zero genes in Schwann cells. *J. Neurochemical.* 1998; 71

(4): 1765.

**Dørup, J., PhD Schacht M., Finn H., Geneser, MD., PhD.** Sección de Informática en Salud. Universidad de Aarhus, Vennelyst. Boulevard 6, DK 8000 Aarhus C, Dinamarca. 2000.

**Donald J., Triple J.** Llama immunoglobulin G (IgG) and it' role as an indicator of health status. 1991; 23: 28.

**Deeg H. J., Storb R.,** Canine bone marrow transplantation model. Curr. Topics. Vet. Res. 1994; 1: 103-114.

**Dumitru D.** Reaction of the peripheral nervous system te injury. În Electrodiagnostic Medicine. Ed Hanley-Belfus, Inc., Philadelphia. 1994; 341.

**Edel N., Gui., J.** Induction of neutralizing antibody and Th2 cell by intranasal immunization with a mutant of diphteria toxin formulated with chitosan. Blackwell Science. Ltd. 1999; 98 (1): 83.

**Engel S. R., Purdy R. H., Grant K., A.** Characterization of discriminative stimulus effects of the neuroactive steroid pregnenolone. J. Pharmacol. Exp. Ther. 2001; 29: 48-95.

**Fahey J. L., McKelvey E., M.** Cuantitative determination of serum immunoglobulins in antibody agar plates. J. Immunology. 1965; 94: 84.

**Felt O., Buri P., Gurny R.** Chitosan unique polysaccharide for drug delivery. Drug Dev. Ind. Pharm. 1999; 24: 979-993.

**Forssman J.** Uber die Ursachen welche die Wachstumsrichtung der peripheren Nerven fasern bel der regeneration bestimmen. Beit Pat hologicisc. Anat. Aligem Pathol. 1989; 24: 56.

**Gabrielson G., Stenstrom J.** Contribution to peripheral nerve suture technique. Plast. Reconstr. Surg. 1996; 38: 68.

**Ganong W.** Tejido excitable Nervio. In fisiología médica. Ed: Manual Moderno S.A de C.V. México D.F.- Santa Fé de Bogota, 16va edición. 1997. pg. 57.

**Garbay B., Heape A.M., Sargueil F., Cassagne C.** Mielin synthesis in the peripheral nervous system. Progress in Neurobiology. 2000; 61:267-304.

**Garcia-Etrada J., Del Rio J. A., Luquin S., Soriano E. Y García-Segura L.M.** Gonadal hormones down regulate reactive gliosis and astrocyte proliferation after a

penetrating brain injury. *Brain Res.* 1993; 628: 271-278.

**Gebhard D. H., Carter P.** Identification of canine lymphocyte subsets with monoclonal antibodies. *Veterinary. Immunology. Immunopathol.* 1992; 32: 187-199.

**Gil J.** Protocolo de disección del perro. Editorial Masson S. A. España. 1997; 159-163.

**Gómez-Pinedo, U. and L., D. F., Chávez-Delgado E, Mora-Galindo J. González-Pérez O, Bañuelos-Pineda J, García-Estrada J, et al.,** Utilización de prótesis de quitosana y silicona en la regeneración del nervio ciático axotomizado de ratas. *Arch Neurocién. (Mex).* 2001; 6 (4) : 184-193.

**Goedert s,, Schissi B., Zunníc M., Schiebl C., Mayer P.** In vitro IgE but not IgG production of canine peripheral blood B cells is inhibited by CD40 ligation. *Veterinary. Immunology. Immunopathology.* 2000; 75: 135-149.

**Goran L., Malmo S.** 25- year perspective of peripheral nerve surgery: Evolving neuroscientific concepts and clinical significance. *The journal of Hand Surgery, New York.* 2000; 25a (3): 391.

**Hadlock T., Sundback C., Hunter D., Cheney M., Vacanti J. P.** A polymer form conduit seeded with Schwann cells promotes guided peripheral nerve regeneration. *Tissue. Eng.* 2000; 6: 119-127.

**Hann Bonnekoh P., Scheidt P., Friede R.** Myelin phagocytosis by peritoneal macrophages in organ cultures of mouse peripheral nerve. A new model for studying myelin phagocytosis in vitro. *J. Neuropathol.* 1989; 48: 140.

**Haipeng Gong.** Studies on nerve cell affinity cell of chitosan-deriveted materials *Journal of Biomedical Materials Research.* 2000; 52: 285-295.

**Halliwel R. E., W. Gorman N., T.** *Veterinary Clinical Immunology.* W.B. Saunders. Philadelphia P.A. U.S.A. (1989).

**Hitomi N., Kiochi N., Harumi H., Hideo O., Yasuhiko H.** Effects of aging on numbers, sizes and conduction velocities of myelinated and unmyelinated fibers of the pelvic nerve in rats. *Journal of the Anatomic Nervous System.* 1997; 69: 148-155.

**Hogen E. H., Felsburg P., J.** *Immunohistology of peyer's patches in the dog.*

Veterinary. Immunology. Immunopathol. 1992a; 30: 147-160.

**Hurtado Hernán, Bernard Knoops, Philippe Van Den Bosch de Aguilar.** Rat sciatic nerve regeneration in semipermeable artificial tubes. *Exp. Neurol.* 1987; 97: 751.

**Ide C.** Peripheral nerve regeneration. *Neurosci Res.* 1996; 25: 101.

**Ide C.** Role of extracellular matrix the regeneration of a painian corpuscle. *Brain Res.* 1987; 413: 155.

**Ide C., Tohyama K., Yokota R., Nitaton T., Onodera S.** Schwann cell basal lamina and nerve regeneration. *Brain Res.* 1983; 288: 61.

**Jamela S. R., Jayakrishanan A.** Glutaraldehyde cross-linked chitosan microspheres as along acting biodegradable drug delivery vehicle studies on the in vitro release of mitoxantrone and in vivo degradation of microspheres in rat muscle. *Biomaterials.* 1995; 16: 769-775.

**Jamela S. R., Kumary T. V., Jayakrishanan A.** Progesterone- loaded chitosan microspheres: long acting biodegradable controlled delivery system. *J. Control. Rel.* 1998; 52: 17-24.

**Jung-Testas I., Hu Z., Baulieu E., Robel P.** Neurosteroids Biosynthesis of pregnenolone as progesterone in primary cultures of glial cells. *Endocrinology.* 1989; 125: 2083.

**Jung-Testas I., Sxhumacher M., Robel M., Baulieu E.** Actiones of steroids hormones and growth factors on glial cells of the central and peripheral nervous system. *J. Steroids Biochem. Molec.* 1994; 48: 145-154.

**Kas H. S.** Chitosan properties preparations and application to microparticulate systems. *J. Micro. Encap.* 1997; 14: 689-711.

**Karl I.** Transfer factor colostrums hyperimmune milk. U.S. Department of Commerce. 2000; Bulletin U.S.A..

**Kable W., Leonhardt H., Piatzer W.** Sistema nervioso y órganos de los sentidos. En *Atlas de Anatomía.* Ed. Omega, S.A. Plató- Barcelona. 1988; 34.

**Kanje M., Lundborg G., Edstróm A.** A New method for studies of the effects of locally applied drugs en peripheral, nerve regeneration in vivo. *Brain Res.* 1988; 439: 116.

**Kelleher M. O., Al-abri R. K.** The use of conventional and invaginated autologous vein for nerve repair by means of entubulation. *British Journal of Plastic Surgery*. 2001; 54 (1): 53-57.

**Koenig H. L., Schumacher M., Ferzaz B., Do Thi AN, Ressouches A, Guennoun R, et al.** Progesterone synthesis and myelin formation by Schwann Cells. *Science*. 1995; 268: 1500-1503.

**Kuang Y.** Experimental study of the effect on growth of schwann cell from chitin and chitosan in vitro. Department of Orthopedics Surgery Military Hospital. 1998; 12 (2): 90-93.

**Kumar G., Smith P.J., Payne G.F.** Enzymatic grafting of a natural product onto chitosan to confer water solubility under basic conditions. *Biotechnol. Bioeng.* 1999; 63: 154.

**Langone F., Lora S., Veronese F.M., Caliceti P., Parnigotto P.P., Valenti F., y col.** Ocurrent: Peripheral nerve repair using a poly phosphazene tubular prothesis. *Biomaterials* 1995; 16: 347-53.

**Lee K., Ha W., Park W.** Blood compatibility and biodegradability of partially N-acetylated chitosan derivateds. *Biomaterials*. 1995; 16: 1211.

**López Antúnez.** Anatomía funcional del sistema nervioso. Cuarta edición. Editorial Limusa Noriega. 1990; 131-284.

**Lindholm D., Heumann R., Meyer M.** interteukin-1 regulates synthesis of nerve growth factor in non-neuronal cells of cat sciatic nerve. *Natura*. 1987; 330: 658.

**Luyn M., Khouw P., Wachem E., Blaauw J., Werkmeister.** Modulation of the tissue reaction biomaterials. II. The functional of T cell in the inflammatory reaction to cross linked collagen implanted in T-cell-deficient rat. *J. Biomed. Mater. Res.* 1998; 39: 398-406.

**Lundborg G., Bongo F., Varon S.** Nerve regeneration model and trophic factors in vivo. *Brain Res*. 1982; 232: 157.

**Lundborg G., Rosen G., Abrahamson S., Dahlin L., Danielsen N.** Tubular repair of the median nerve in the human forearm. *J. Hand. Surg. Britsh. Eur.* 1994; 19b: 273.

**Mackinnon S., Dellon A., Hudson A.** Chronic nerve compression-an experimental

model. *Ann Plast Surg.* 1984; 13: 112.

**Macleoid G. S., Collett J. H., Fell J.T.** The potential use of mixed films of pectin, chitosan and HPMC for bimodal drug release. *J Controlled Release.* 1999; 58: 303.

**Madison R., Archibald S.** Point sources of Schwann Cells result in growth into a nerve entubulation repair site in the absence of axons: effects of freeze-thawing. *Exp. Neurol.* 1994; 128: 266.

**Mazza G., Whiting A. H.** Development of an enzyme-linked immunoasorbent assay for the detection of IgG sub classes in the serum of normal and diseased dogs. *Res. Vet. Sci.* 1994; 57: 133-139.

**Marginí A. R.** La respuesta inmune. *Revista de la divulgación y tecnológica de la asociación de hoy. Facultad de farmacia y Bioquímica-UBA.* 1997; 6: 36.

**Mancini G. Carbonara A.D. Helremians J.F.** Immunochemical quantitation of antigens by Single Radial Immunodifusion. *Immunochemistry* 1965; 2: 235-254.

**Melgacani R., C. Riva M, A., Fumagalli F., Magnaghi V., Racagni G., Martín L.** Effect of progesterone, testosterone and their 5alfa-reduced metabolites on GFAP gene expresión in type 1 astrocytes. *Brain Res.* 1996; 711: 10-15.

**Mateos-Rodríguez F., Pérez-Arellano J. L., Blázquez-Cabrera J. A., Plaza-Almeda.** *J. Inflamación (I) Jano.* 1998; 55: 1266-78.

**Miller G, K., Benjamin S. A.** Radiation-Induced quantitative alterations in prenatal thymic development in the beagle dog. *Lab. Invest.* 1985; 52: 224-23.

**Miledi R., Salter O.** The degeneration of neuromuscularjunctions after nerve section. *J. Physiol.* 1970; 207: 507.

**Mitsui Y., Schmelzer J. D., Zilman P.J., Mitsui M., Trischier H.J., Low P. A.** Alpha-lipoic acid provides neuroprotection from ischemia-reperfusion injury of peripheral nerve. *J. Neurol Sci.* 1999; 163: 11-16.

**Morgan S. J., Darling D. C.** Cultivo de células animales parte: 2 técnicas y aplicaciones. Editorial Limusa. Edición Acribía 1995; 91: 105.

**Moriello P. 6., Deber D. J.** Concentration of total serum IgE , IgA and IgG in atopic and pamsited dogs. *Vet. Immunopathol.* 1995; 44: 105-113.

**Muzzarelli R.A., Mattioli-Belmonte M., Tietz C.Biagini R., Refioli G., Brunelli M. A.** Simulatory effect on bone formation exerted by a modified chitosan.

Biomaterials. 1994; 15: 1075-81.

**Muzzarelli M. A., Mattioli-Belmonte M., Pugnali A., Biagini G.** Biochemistry, histology and clinical uses of chitins and chitosan in wound healing. *EXS*. 1999; 87: 251-265.

**Navarro X., Verdú E., Butí M.** Comparison of regenerative and reinnervating capabilities of different functional types of nerve fibers. *Exp. Neurol.* 1994; 129: 217.

**Olivry T., Naydan D. K.** Characterization of the cutaneous inflammatory infiltrate in canine atopic dermatitis. *Am. J. Dermatopathol.* 1997; 19: 477-486.

**Onishi H., Machida Y.** Biodegradation and distribution of water-soluble chitosan in mice. *Biomaterials.* 1999; 20: 175.

**Ozmeric N., Ozcan G., Haylac C. M., Alaadinoglu E. E., Sargon M. F., Sennel S.** Chitosan film enriched with an antioxidant agent, taurine, in fenestration defects. *Journal of Biomedical Materials Research.* 2000; 51 (3): 500-503.

**Pietro. Motta.** Atlas fotográfico en color de anatomía microscópica. Editorial Científico-Médica. 1974.

**Patel M., Slinger D., Mark G. E., Hickey G. J., Hollis G. F.** Sequence of the dog immunoglobulin alpha and epsilon constant region genes. *Immunogenetic.* 1995; 41: 282-286.

**Pham H. N., Padilla J. A., Nguyen K. D., Rosen J. M.** Comparison of nerve repair techniques: suture vs avitene-polyglycolic acid tube. *J. Reconstr. Microsurg.* 1991; 7: 31-36.

**Ramon y Cajal S.** Experiments dealing with the transplantation of nerves or their products, designed to prove especially an attractive or neurotrophic action on nerve sprouts. In *Degeneration and Regeneration of the Nervous System*. Edited and translated by May. R. New York. Hafner Press. 1928; 329.

**Rao S., Sharma O. P.** Use of chitosan as a biomaterial: studies on its safety and hemostatic potential. *J. Biomed. Mater. Res.* 1997; 34: 21.

**Reynolds H. Y., Johnson J. S.** Quantitation of canine immunoglobulins. *J. Immunol.* 1970; 105: 698-703.

**Rende M., Granate A., Lo Monaco M., Zelano G., Toesca A.** Accuracy of

reinnervation by peripheral nerve axons regenerating across a 10 mm gap within an impermeable chamber. *Exp. Neurol.* 1991; 111: 332.

**Riott I., Brostoff J., Male D.** *Inmunologia* Quinta edición. España. 2000; 61-69

**Robert F., Guennoun R., Desamaud F.** Synthesis of progesterone in schwann cell regulation by sensory neurons. *Eur. J. Neurosci.* 2001; 13 (5): 916-924.

**Salonen y., Peltonen J., Roytta M. Virtanen I.** Laminin in traumatized peripheral nerve: basement membrane changes during degeneration and regeneration. *J. Neurocytol.* 1987; 16: 713.

**Sanes J.** Laminin for axonal guidance. *J. Natura.* 1985; 315: 714.

**Saintigny G., Bonnard M., Damour O., Collombel O.** Reconstruction epidermis on a chitosan cross- linked collagen-GAG fibroblast. *Acta Derm. Venerol.* 1993; 73: 175-80.

**Sinke J. D., Thopen I.** Immunophenotyping of skin-infiltrating T-cell subsets in dog with atopic dermatíds. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 1997; 57: 13-23.

**Sisson J. D. Grossman y Robert Getty.** *Anatomia de los Animales Domesticos.* Quinta Edición, Salvat Editores S.A. 1982; 209-231.

**Shepherd R., Reader S., Falshaw A.** Chitosan functional properties. *J. Glycoconj.* 1997; 14: 535.

**Snyder P. W., Kazaco E. A., Felsburg P. J.** Histology Characterization of the thymus in canine X-linked severe combined immunodeficiency. *Clin. Immunol. Immunopathology.* 1993; 67: 55-67.

**Sjbborg J., Kanje M.** The Initial period of peripheral nerve regeneration and the importance of the local environment for the conditioning lesion effect. *Brain Res.* 1990; 529: 79.

**Smith J.** Microsurgery of peripheral nerves. *Plast. Reconstr. Surg.* 1964; 33: 31

**Studdert V, P., Phillips W. a., Studdert m. J.** Recurrent and persistent infections in related Weimaraner dogs. *Aust. Vet.* 1984; 61: 261-263.

**Stoll G., Griffin J., Li CV.** Wallerian degeneration in the peripheral nervous system. Participation of both Schwann cells and macrophages in myelin degradation. *J. Neurocytol.* 1989; 18: 671-683.

**Spector G., Lee P., Derby A., Frierdich G., Neises G., Roufa O.** Rabbit facial

nerve regeneration in NGF-containing silastic tubes. *Laryngoscope*. 1993; 103: 548-558.

**Spector G., Lee P., Derby A., Fnerdich G., Burke J., Vogler P.** Facial nerve regeneration through semipermeable chambers in the rabbit. *Laryngoscope*. 1992; 102: 784-796.

**Spector G., Lee P., Derby A., Roufa D.** Early stages of facial nerve regeneration through silicone chambers in the rabbit. *Laryngoscope*. 1991b; 101: 109-123.

**Spector J., Lee P., Peterein J., Roufa D.** Facial nerve regeneration through autologous nerve grafts: A clinical and experimental study. *Laryngoscope*. 1991a; 101: 537-554.

**Spencer P., Weinberg H., Krygier-Brevart V.** An in vivo method to prepare normal Schwann cells free of axons and myelin. *Brain Res*. 1979; 165: 119.

**Suzuki Y., Tanihara M., Ohnishi K., Endo K., Nishimura Y.** Cat peripheral nerve regeneration across 50 mm gap repaired with a novel nerve guide composed of freeze-dried alginate gel. *Neurosci. Lett*. 1999; 259: 75-78.

**Suzuki Y., Tanihara M., Ohnishi K., Hashimoto T., Endo K., Nishimura Y.** Reconstruction of rat peripheral nerve gap without sutures using freeze-dried alginate gel. *J. Biomed. Mater. Res*. 2000; 49: 528-533.

**Tang L.** Molecular determinants of acute inflammatory response to biomaterials. *J. Clin. Invest*. 1996; 97: 1329-1334.

**Terris O. J., Fee W.E., MD.** Current issues in nerve reappear. *Arch Otorrinlaryngoscope. Head. Neck. Surg*. 1993; 119: 725-731.

**Tizard I. R.** *Veterinary Immunology* 5th edn. W.B. Saunders Philadelphia PA, USA. 1996.

**Tomihata K., Ikada Y.** In vitro and in vivo degradation of films of chitin and its deacetylated derivatives. *Biomaterials* 1997; 18: 567-575.

**Thomas P.K., Jones D. G.** the cellular response to nerve injury II: regeneration of the perineurium after nerve section. *J. Ant*. 1967; 101: 45-55.

**Trapp G., Hauer P., Lemke G.** Axonal regulation of myelin protein mRNA levels in actively myelinating Schwann cells. *J. Neurosci*. 1988; 8: 3515.

**Varon S., Hagg Theo.** Models the evaluate effects of neurotrophic factors en

axonal regeneration: Neurotrophic factors In: Neuromethods. Vol: Eds: A. Boulton, G. Bakeer, and F. Hefti. The human. Press. Inc. 1993; 25: 371.

**Weiss P.** The technology of nerve regeneration: suture less tubulation and related methods of nerve repair. Neurosurgery. 1944; 1: 400-450.

**Williams L.** Exogenous fibrin matrix precursors stimulate the temporal progress of nerve regeneration within a silicone chamber. Neurochem Res. 1987; 12: 851.

**Williams L., Azzam N., Zalewski A., Azzam R.** Regeneration axons are not required to induce the formation of a Schwann cell cable in a silicone chamber. Exp. Neuroci. 1993; 120: 49.

**Williams L., Longo F., Powell H.,** Spatial temporal progress of peripheral nerve regeneration in a silicone chamber parameters for a bioassay. J. Comp. Neeurol. 1983; 218: 460.

**Wooley P., Nasser S., Fitzgerald R.** The immune response to implant materials in humans. Fundamental and clinical immunology of the skeletal system. 1996; 326: 63-70.

**Wu O.** Tissue engineering study on repaimient of injured nerve gap in mt. Dept of Orthopedic Surgery Hospital Military Of China. 1997; 14 (2): 108-10.

**Yang M., Backer A. B., Simon F. E.** Identification of a dog IgD like molecule by a monoclonal antibody. Vet. Immunol. Immunopathol. 1995; 47: 215-247.

**Yoshimoto H., Nagano N., nishitoba I., Sato H., Miyata S., Kusaka M.** pharmacological properties of coated diacetaldehyde cellulose a newly developed oral adsorbent. Effect of chitosan DAC in normal rats. Nippon Yakungaku Asshi 1995; 106: 113-22.

**Yoshii S., Oka M.** Peripheral nerve regeneration along collagen filaments. Brain. Research. 2001; 888 (1): 158-162.