



UNIVERSIDAD DE GUADALAJARA

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

Regeneración del nervio facial en conejos por la influencia *in situ* de neuroesteroides liberados desde una prótesis de quitosana

TESIS

que para obtener el grado de
DOCTOR EN CIENCIA DEL COMPORTAMIENTO
(Opción Neurociencias)

Presenta

María Estela Chávez Delgado

Comité Tutorial y Sinodales

Dr. Joaquín García Estrada (Director)

Dr. Jorge Juárez González

Dra. Marisela Hernández González

Dr. Carlos Beas Zárate

Dr. Juan Mora Galindo

Dr. Fernando A. López-Dellamary y Toral

El presente trabajo fue financiado por CONACYT (28893) y fue desarrollado en el Laboratorio de Biología Celular y Neuroendocrinología Celular del Centro de Investigación Biomédica de Occidente, del Instituto Mexicano del Seguro Social.

El biomaterial “Quitosa” fue proporcionado gratuitamente por el Dr. en Cs. Fernando López-Dellamary Toral, encargado del Departamento de Polímeros del Centro Universitario de Ciencias Exactas e Ingeniería de la Universidad de Guadalajara y del proyecto CONACYT (28893).

Agradezco la colaboración económica que me brindó el proyecto de CONACYT-Academia Nacional de Ciencias de Hungría (E130-3058), durante la estancia en el Laboratorio de Neurobiología molecular del Institute of Biophysics Biological Research Centre Hungarian Academy of Science, en Szeged, Hungría, a cargo del Dr en Cs. Arpad Parduzc.

MEMORIAS

CONGRESO DE INVESTIGACIÓN UAG'2000 Y 3ER ENCUENTRO DE LA RED DE INVESTIGACIÓN EDUCATIVA. Participación con el trabajo “Regeneración del nervio facial en conejos con una prótesis de quitosana y la influencia *in situ* de neuroesteroides”. Guadalajara, Jal., Noviembre de 2000.

I CONGRESO NACIONAL DE CONACYT. “Regeneración del nervio facial en conejos con una prótesis de quitosana y la influencia *in situ* de neuroesteroides”. Veracruz, Ver., Agosto de 2000.

LI CONGRESO NACIONAL DE LA SOCIEDAD MEXICANA DE OTORRINOLARINGOLOGÍA Y CIRUGÍA DE CABEZA Y CUELLO. “Quitosana-guía nerviosa biodegradable y vehículo de liberación de neuroesteroides en la regeneración del nervio facial de conejos, análisis ultraestructural”. Premiado con el 1er lugar en la categoría de Investigación. León Gto., Mayo de 2001.

X FORO NACIONAL DE INVESTIGACIÓN EN SALUD. “Regeneración del nervio facial en conejos con una prótesis de quitosana y la influencia *in situ* de neuroesteroides”. Cocoyoc, Mor., Septiembre de 2001.

Índice

Página

ABREVIATURAS	-----	I
RESUMEN	-----	II

ANTECEDENTES

PRIMERA SECCIÓN

MICROSCOPIA DE LUZ Y ULTRAESTRUCTURAL DEL NERVIOPERIFÉRICO Y CELULAS NERVIOSAS

1. MORFOLOGÍA DE NERVIOS PERIFÉRICOS	-----	1
1.1 El axón		
1.1.1 Organización ultraestructural		
1.2 Fibras mielinizadas y no mielinizadas		
1.2.1 Morfología ultraestructural		
1.2.2 Morfología microscópica		
2. ULTRAESTRUCTURA DEL NERVIOPERIFÉRICO EN EL DESARROLLO	-----	5
2.1 Cono de crecimiento axónico		
2.2 Estadio temprano		
2.3 Estadio tardío		
2.4 Tipos y funciones de las fibras nerviosas		
3. CÉLULAS DEL SISTEMA NERVIOSO CENTRAL	-----	8
3.1 Características histológicas de las neuronas		
3.2 Ultraestructura de células gliales		
3.3 Núcleo y nervio facial		

SEGUNDA SECCIÓN

CAMBIOS MORFOLÓGICOS EN EL SISTEMA NERVIOSO CENTRAL Y PERIFÉRICO POSTERIOR A AXOTOMIA

4 ALTERACIONES EN EL SNC Y SNP POSTERIOR A AXOTOMIA	-----	13
4.1 Degeneración Walleriana		
4.2 Respuesta retrógrada		
4.2.1 Degeneración neuronal		
4.2.2 Gliosis		
4.2.2.1 Astrocitosis reactiva		
4.2.2.2 Microglia reactiva		

TERCERA SECCIÓN
TÉCNICAS QUIRÚRGICAS EN LA REPARACIÓN DE NERVIOS
PERIFÉRICOS Y UTILIDAD DE BIOMATERIALES

5 REPARACIÓN QUIRÚRGICA EN NERVIOS PERIFÉRICOS -----	18
5.1 Historia de la reparación nerviosa	
5.2 Reparación nerviosa mediante tubulización	
5.2.1 Cámaras axónicas de materiales biológicos y no biológicos	
5.2.2 Quitosana	

CUARTA SECCIÓN
NEUROESTEROIDES

6 NEUROESTEROIDES -----	25
6.1 Definición y biosíntesis	
6.2 Significancia biológica	
6.3 Síntesis de neuroesteroides por células de Schwann	
6.4 Promoción de mielinización por progesterona	
6.5 Neuroesteroides en gliosis reactiva	

QUINTA SECCIÓN
PROCESO REGENERATIVO EN NERVIOS PERIFÉRICOS

7 REGENERACIÓN NERVIOSA -----	29
7.1 Estadios regenerativos en nervios tubulizados	
7.2 Funciones de las células de Schwann durante la regeneración nerviosa	
7.3 Importancia de la vaina de mielina	
7.3.1 Composición de mielina en el SNP	
7.3.2 Mielinización del SNP	
7.3.2.1 Factores que contribuyen en la mielinización	
7.3.2.2 Síntesis de mielina	

METODOLOGIA

PRIMERA SECCIÓN

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	35
HIPOTESIS	
OBJETIVO GENERAL Y PARTICULARES	

SEGUNDA SECCIÓN

MÉTODOS GENERALES

8 MÉTODOS GENERALES	39
8.1 Animales de experimentación	
8.2 Elaboración de las prótesis de quitosana	
8.3 Cromatografía de gases	
8.4 Procedimientos quirúrgicos	
8.4.1 Gonadectomía	
8.4.2 Implante subcutáneo de prótesis de quitosana	
8.4.3 Tubulización de la rama bucal del nervio facial	
8.5 Perfusión intravascular para la eliminación de sangre y fijación de los tejidos	
8.6 Procesamiento de crecimientos nervios para estudios con microscopía de luz y electrónica de transmisión	
8.7 Procesamiento del NMNF para estudio con microscopía de luz y electrónica de transmisión	
8.8 Tinción del tejido nervioso (NMNF y crecimiento nervioso) con azul de toluidina	

TERCERA SECCIÓN

DISEÑOS EXPERIMENTALES

9 DISEÑOS EXPERIMENTALES	46
9.1 Análisis por cromatografía de gases de la liberación “ <i>in vivo</i> ” de neuroesteroides desde la prótesis de quitosana	
9.2 Análisis histológico de la pared de las prótesis de quitosana implantadas en el espacio subcutáneo y manifestaciones clínicas	
9.3 Análisis de la prótesis de quitosana y la influencia “ <i>in situ</i> ”	

- de neuroesteroides sobre la regeneración del nervio facial
en lesiones con solución de continuidad de 10 mm
- 9.4 Respuesta neuronal y glial en el NMNF axotomizado y tubulizado
con prótesis de quitosana y neuroesteroides

RESULTADOS

PRIMERA SECCIÓN

ESTUDIOS HISTOLOGICOS Y CROMATOGRAFÍA DE GASES

- 10 ANÁLISIS HISTOLÓGICO DE LAS PRÓTESIS DE QUITOSANA
IMPLANTADAS EN EL ESPACIO SUBCUTÁNEO Y
LIBERACIÓN DE NEUROESTEROIDES ----- 54
- 10.1 Cromatografía de gases
- 10.2 Estudios histológicos

SEGUNDA SECCIÓN

REGENERACIÓN DEL NERVIIO FACIAL EN PRÓTESIS DE QUITOSANA CON NEUROESTEROIDES

- 11 ANÁLISIS DE CRECIMIENTOS NERVIOSOS EN LAS
PRÓTESIS DE QUITOSANA ----- 57
- 11.1 Porcentaje de éxito
- 11.2 Análisis ultraestructural del nervio en regeneración a los 15 días
- 11.2.1 Células de origen mesodérmico
- 11.2.2 Células de origen ectodérmico
- 11.3 Análisis morfométrico mediante microscopía de luz del nervio en
regeneración, a los 45 días
- 11.3.1 Morfología general
- 11.3.2 Proporción "n"
- 11.3.3 Análisis cuantitativo de fibras mielinizadas
- 11.4 Análisis morfométrico ultraestructural de los crecimientos nerviosos
a los 45 días
- 11.4.1 Morfología general
- 11.4.2 Análisis ultraestructural de fibras nerviosas
(promedio, diámetro, área y proporción "g")

TERCERA SECCIÓN
EFECTOS EN EL NÚCLEO DEL NERVI0 FACIAL
LESIONADO POR AXOTOMÍA

12	ESTUDIO DEL NÚCLEO MOTOR DEL NERVI0 FACIAL LESIONADO POR AXOTOMÍA -----	76
	12.1 Análisis morfométrico mediante microscopía de luz de la población neuronal	
	12.2 Análisis morfométrico mediante microscopía electrónica de transmisión en células gliales	

DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES

	BIOMATERIAL QUITOSANA -----	86
	REGENERACIÓN DEL NERVI0 FACIAL -----	90
	NÚCLEO MOTOR -----	98
	CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS -----	102
13	REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS -----	104

Abreviaturas

ADN	<i>Ácido desoxirribonucleico</i>
ANOVA	<i>Análisis de variancia aleatorizada</i>
AMPc	<i>Adenosina-5-monofosfato cíclico</i>
ARN	<i>Ácido ribonucleico</i>
Brdu	<i>Bromodeoxiuridina</i>
CNTF	<i>Factor neurotrófico ciliar</i>
CNPasa	<i>Nucleótido cíclico fosfodiesterasa</i>
DHA	<i>Dehidroepiandrosterona</i>
LD	<i>Líneas densas</i>
FGF	<i>Factor de crecimiento de fibroblastos</i>
GABA	<i>Acido gamma-aminobutírico</i>
GFAP	<i>Proteína ácida fibrilar glial</i>
HRP	<i>Peroxidasa de raíz fuerte</i>
IGF-1	<i>Factor de crecimiento-1 similar a la insulina</i>
Ip	<i>Intraperitoneal</i>
IL	<i>Línea intraperiodo</i>
MET	<i>Microscopía electrónica de transmisión</i>
MAG	<i>Glucoproteína asociada a la mielina</i>
MBP	<i>Proteína básica de mielina</i>
MHC	<i>Complejo mayor de histocompatibilidad</i>
N-ACM	<i>Moléculas de adhesión celular neural</i>
N-caderina	<i>Caderina neural</i>
NGF	<i>Factor de crecimiento nervioso</i>
NGFR	<i>Receptor del factor de crecimiento nervioso</i>
NMNF	<i>Núcleo motor del nervio facial</i>
PLA	<i>Ácido-poli-láctico</i>
PGA	<i>Ácido-poli-glicólico</i>
PO	<i>Proteína cero</i>
PMP22	<i>Proteína de mielina periférica -22</i>
PREG	<i>Pregnenolona</i>

PROG	<i>Progesterona</i>
RP	<i>Receptor de progesterona</i>
P450	<i>Citocromo P450</i>
RCP-RT	<i>Retrotranscripción de la reacción en cadena de la polimerasa</i>
ARNm	<i>Ácido ribonucleico mensajero</i>
CS	<i>Células de Schwann</i>
sc	<i>Subcutáneo</i>
SN	<i>Sistema Nervioso</i>
SNC	<i>Sistema Nervioso Central</i>
SNP	<i>Sistema Nervioso Periférico</i>
TGF	<i>Factor transformante del crecimiento</i>
TNF	<i>Factor de necrosis tumoral</i>
TNX	<i>Tenacina</i>

RESUMEN

Recientemente se han desarrollado nuevos métodos de reparación quirúrgica basados en el recurso de tubulización, utilizando biomateriales capaces de contener células vivas y ejercer efectos neurotróficos al liberar compuestos directamente al tejido lesionado. Este modelo se utilizó en el presente trabajo para inducir la regeneración nerviosa en la rama bucal del nervio facial, a través de una prótesis de quitosana conteniendo en sus paredes neuroesteroides (PROG, PREG ó DHA) para facilitar el crecimiento axonal y modular la respuesta glial mediante su liberación “*in situ*”.

Se realizaron estudios de cromatografía de gases para cuantificar la liberación del contenido de los neuroesteroides desde la pared de las prótesis de quitosana implantadas en el tejido sc, a diferentes tiempos post-implantación y las paredes de las mismas se analizaron por métodos histológicos. Los crecimientos nerviosos resultantes en las prótesis y el núcleo motor del nervio facial, fueron analizados por estudios de microscopía de luz y microscopía electrónica de transmisión.

Los neuroesteroides de las prótesis implantadas sc, se liberaron durante un periodo mayor a 60 días, tiempo necesario para que suceda crecimiento nervioso. Entre los diferentes grupos de estudio, se obtuvieron diferencias notables en la regeneración del nervio facial axotomizado-tubulizado. Desde los primeros 15 días se distinguieron fibras no mielinizadas y células de Schwann en el segmento proximal y distal; a los 45 días se identificaron fibras mielinizadas con diferente diámetro y espesor de la vaina de mielina. La presencia de progesterona depositada en las paredes de quitosana produjo la mejor organización estructural del nervio facial regenerado, caracterizada por – mayor número de fibras mielinizadas y no mielinizadas, diámetro axónico, proporción “n” y “g”. Las principales diferencias de éstos parámetros fueron con respecto a tejidos de nervios control vehículo.

La axotomía de la rama bucal del nervio facial produjo cambios morfológicos significativos en neuronas y células gliales, demostradas al comparar los valores promedio de las estructuras del control intacto; sin embargo, éstos cambios no fueron modificados por la administración de PROG, PREG ó DHA cuando se compararon con los valores del grupo control VEH.

Se demostró que la prótesis de quitosana y neuroesteroides resultó útil como vehículo de liberación y facilitó la regeneración del nervio facial en conejos; en particular, el neuroesteroide progesterona produjo efectos benéficos en la respuesta regenerativa, lo que permite proponer su utilización con fines terapéuticos en la reparación de nervios periféricos seccionados de causa traumática.

CAPITULO 1

MORFOLOGÍA DE NERVIOS PERIFÉRICOS

1.1 EL AXÓN

1.1.1 Organización ultraestructural

En vertebrados, los axones son prolongaciones únicas en su origen, pueden proyectarse localmente y extenderse de una parte del Sistema Nervioso (SN) a otra; -central, periférico y autonómico. Generalmente, los axones de proyección local (axones de Golgi de las neuronas tipo II) no están mielinizados, en cambio; los que cruzan de una región a otra (axones de Golgi de las neuronas tipo I) son mielinizados (Peters y cols., 1991; Ganong 1997).

El axón se desprende del soma neuronal mediante una prominencia axónica, ésta se distingue mediante métodos histológicos por tinción deficiente de la sustancia de Nissl, (basófilo) y también se identifica fácilmente en micrografías electrónicas (Fig. 1,a). En su citoplasma se distinguen -mitocondrias, microtúbulos, neurofilamentos, microfilamentos, retículo endoplásmico liso y rugoso ribosomas libres y aparato de Golgi (Peters y cols., 1991) (Fig. 1, ab). Sin embargo, después del cuello axónico y segmento inicial, éste se distingue por la presencia de *neurofilamentos*, *microtúbulos*, *retículo endoplásmico liso* y *mitocondrias* (Fig. 2,a).

Los primeros son de estructura cilíndrica (10 nm Ø) y longitud indefinida. En cortes transversales se identifican por paredes electro-densas (3 nm) rodeadas por un centro electro-lúcido y en cortes longitudinales se observan dos líneas electro-densas, paralelas y separadas por una zona brillante (Peters y cols., 1991); éstos predominan en axones grandes mientras que, en los pequeños, se reduce la relación de neurofilamentos/*microtúbulos*, éstos últimos son estructuras tubulares, de mayor diámetro (20-26 nm Ø) que los neurofilamentos, en cortes transversales (Fig. 1 y 2), tienen un centro claro y se distingue un punto central denso, que puede corresponder a un filamento central (Peters y cols., 1991; Ganong 1997).

El *retículo endoplásmico liso* tiene aspecto tubular y sacos orientados paralelamente a la longitud del axón, en cortes transversales se observan como siluetas redondas, ó cisternas aplanadas (Fig. 2,a). Este sistema se extiende desde el cuerpo celular hasta las terminales axónicas. Las *mitocondrias* son delgadas y tienen varios µm de longitud, se orientan en paralelo, a lo largo del axón

(Fig. 1 y 2); no poseen características distintivas, sin embargo; son más cortas en los botones terminales y están asociadas con los acúmulos de vesículas sinápticas (Peters y cols., 1991).

Por otra parte, la membrana plasmática del axón-*axolema* (7 a 8 nm), se distingue por dos estructuras tri-laminares- dos áreas densas separadas por una brillante. La capa externa, es menos densa que la adyacente al *axoplasma* (Fig. 1,b). Se ha detectado aumento del grosor y densidad del axolema (12-15 nm) durante la excitación nerviosa (Peters y cols., 1991; Dumitru, 1994; Ganong 1997).

Finalmente, el axón termina en su órgano diana en terminales presinápticas (especializaciones membranales), que contienen las vesículas donde se almacena el neurotransmisor sintetizado por el soma (Ganong, 1997) (Fig. 2,a).

1.2 FIBRAS MIELINIZADAS Y NO MIELINIZADAS

1.2.1 Morfología ultraestructural

Los primeros estudios en mielina periférica mediante microscopía electrónica, fueron hechos por Sjöstrand y Fernández-Morán (1950) (Peters y col., 1991). Inicialmente se demostró la existencia de lamelas, posteriormente se reveló que la mielina tenía una *estructura concéntrica multilamelar*, debido a que éstas se repiten radialmente en intervalos aproximados de 12 nm (Webster, 1971,1984; Garbay y col., 2000) (Fig. 3). Las lamelas derivan de la membrana plasmática de las células de Schwann (CS) y son en realidad, las vueltas de un par de membranas plasmáticas enrolladas en espirales que terminan en dos regiones; -la cara externa de la membrana -*mesaxón externo* (Fig. 3, *mes_o*) y la cara interna de la vaina -*mesaxón interno* (Fig. 3, *mes_i*).

La aposición de la cara externa citoplasmática de CS, forma las líneas intraperiodos (Fig. 3, *LI*) y se alternan con líneas densas producidas por la aposición de la cara interna citoplasmática del mismo par de membranas plasmáticas de CS (Peters y col., 1991; Garbay y col., 2000) (Fig. 3, *LD*). La interpretación de las líneas *LI* y *LD*, significan el sitio de formación de la vaina de mielina, las primeras contienen la glucoproteína *PO* y las segundas la proteína básica de mielina (Omlin, 1982; Garbay y col., 2000).

Por otra parte, la estructura de las fibras amielínicas fue observada por Gasser (1952,1955), mediante microscopía electrónica de transmisión (Peters y col., 1991); y observó que una de las características principales de las fibras amielínicas es la forma de cómo son envueltas por las SC; de esta manera, identificó en varias especies animales -gatos, ratas y humanos, que éstas se introducen individualmente en la superficie de las CS mediante muescas que se convierten posteriormente en canales (Fig. 4). Así, cada CS puede envolver de 5 a 21 fibras no mielinizadas (Peters y col., 1991); mientras que, fibras mielinizadas son envueltas individualmente por una CS. Además, las fibras no mielinizadas del Sistema nervioso central (SNC), carecen de vainas individuales (Peters y col., 1991; Garbay y col., 2000). Esta célula (CS), es envuelta por una membrana -la lámina basal, que actúa como guía de los crecimientos axónicos durante la regeneración nerviosa (Grant y col., 1999).

1.2.2 Morfología microscópica

El nervio periférico está compuesto de elementos neurales y no neurales: 1) axones, 2) CS y 3) tejido conectivo (Grant y col., 1999). Fibra nerviosa, es el nombre que se le da al axón (o a una dendrita) de una célula nerviosa. Los haces de fibras nerviosas del SNC, se denominan tractos nerviosos y en el Sistema nervioso periférico (SNP) se les llama nervios periféricos.

En ambos sitios, existen dos tipos de fibras nerviosas; -las miélicas y las amielínicas (Dumitru, 1994; Grant y col., 1999). En el SNC los oligodendrocitos son responsables de formar la banda de mielina; ellos pueden formar y mantener vainas de mielina para 60 fibras nerviosas; en cambio, en el SNP la CS sintetiza la banda de mielina y sólo hay una CS por cada segmento de fibra nerviosa. Las vainas de mielina comienzan a formarse antes del nacimiento y durante el primer año de vida (Garbay y col., 2000).

Las fibras mielinizadas y no mielinizadas están contenidas dentro de un compartimiento de tejido conectivo –el *endoneurio* (Fig. 5), el cual está delimitado por –el *perineurio*, banda concéntrica compuesta de células perineurales, alargadas y organizadas en forma compacta. El perineurio divide las fibras nerviosas en fascículos (grupo de fibras) que se agrupan en un compartimiento de tejido conectivo –el *epineurio* interno, éste último es rodeado por varias capas concéntricas de tejido conectivo y forman el *epineurio* externo. Los dos últimos, contienen fibroblastos, macrófagos, mastocitos, vasos sanguíneos y tejido adiposo (Dumitru, 1994; Grant y col., 1999) (Fig. 5).

En fibras mielinizadas, la terminación de una CS y el comienzo de otra, forman el nódulo de Ranvier (Dumitru, 1994; Grant y col., 1999) (Fig. 6). Con microscopía de luz, las vainas de mielina se observan interrumpidas en intervalos regulares a lo largo de su longitud, cada área interrumpida se le nombra -nodo de Ranvier y a cada intervalo, ó segmento de mielina, se le denomina –internodo (Peters y col., 1991; Ganong 1997; Garbay cols., 2000).

CAPITULO 2

ULTRAESTRUCTURA DEL NERVIO EN EL DESARROLLO

2.1 CONO DE CRECIMIENTO AXÓNICO

Los métodos y técnicas utilizadas en la identificación de los conos de crecimiento se iniciaron con preparaciones estándar de microscopía de luz, en material impregnado-Golgi, preparaciones de plata y cultivos tisulares (Peters y col., 1991). Más tarde, con técnicas de marcaje retrógrado con peroxidasa de raíz fuerte y preparaciones de microscopía electrónica con contraste de fase (DeFelipe y col., 1991). Esta última demostró que, los conos de crecimiento terminan en neuritas (axones o dendritas) a través de largas y delgadas prolongaciones llamadas filipodias y lamelipodias; presentan un citoplasma con gran cantidad de retículo endoplásmico liso, vesículas, neurofilamentos y escasos microtúbulos (Peters y col., 1991) (Fig. 7).

Por otra parte, se ha observado que la morfología de los conos de crecimiento se modifica en relación al sitio anatómico; así, lamelipodias y filipodias revelan diversos cambios en movimientos de extensión y retracción, tamaño y número de lamelipodias (Peters y col., 1991).

2.2 ESTADIO TEMPRANO

Durante el desarrollo de un nervio periférico, la fibra nerviosa guía se extiende con movimientos ameboides desde una neurona y su cono de crecimiento sigue la vía de crecimiento (Peters y col., 1991; Garbay y cols., 2000). Mas tarde, la siguen otras fibras, y se unen con CS. Estas son derivadas de la cresta neural y se caracterizan por un patrón migratorio temprano y asociación con fibras nerviosas (Peters y col., 1991). En este estadio, las CS carecen de lamina basal, son ovoides, poseen largos procesos que terminan en expansiones en forma de botón, migran rápidamente en minutos ú horas y más tarde, permanecen estacionarias; el movimiento sucede por mecanismos consecutivos de extensión y retracción de los procesos y movilización del citoplasma; el desplazamiento se produce a una velocidad de 115 $\mu\text{m}/\text{día}$.

Las CS, al estar en contacto con las fibras nerviosas se desplazan con un movimiento al “estilo gusano” (Peters y col., 1991), adquieren forma de huso y la lamina basal, característica distintiva e indicativa de una asociación estable con el complejo CS-axón (Dezawa 2000).

La maduración del nervio avanza del segmento proximal al distal y se distingue por la migración de familias de CS producto de mitosis, que empiezan a invadir y asociarse a grupos de

fibras nerviosas a través de sus procesos; así, las fibras nerviosas son envueltas en forma parcial (Fig. 8,CS₁). Cada familia de CS se identifica por poseer una lámina basal común (Fig. 8), sus prolongaciones citoplasmáticas dividen las fibras nerviosas en grupos y algunos de ellos llegan a segregarse para dirigirse hacia la periferia del grupo de fibras nerviosas (Fig. 8,Ax₁) (Peters y col., 1991; Garbay y col., 2000).

2.3 ESTADIO TARDÍO

La maduración continúa y las CS se asocian con una sola fibra nerviosa, -las de mayor diámetro (Fig. 8, Ax₂ y Fig. 9, Ax₁). Al aumentarse el número de CS, se establece la relación uno a uno. Posteriormente se reduce gradualmente la división de CS y se mantienen sin cambios en su tamaño (Weinstein 1999; Dezawa 2000).

En el SNP, las fibras que serán mielinizadas se aíslan formando surcos en las CS; éstos se profundizan y los bordes de los mismos avanzan juntos hasta unirse para formar el mesaxón (Fig. 9, mes y Fig. 10, ab). Más tarde, alrededor de la fibra nerviosa el mesaxón se elonga en forma de espiral (Fig. 9, Ax₂ y Ax₃ y Fig. 10,cd) (Peters y col., 1991; Garbay y col. 2000). El número de vueltas del mesaxón, es mayor en regiones paranodales que en la región terminal de la CS, donde finalmente se formará el nodo de Ranvier (Peters y col., 1991; Garbay y col., 2000). Una vez que el mesaxón complete entre 3 y 4 vueltas, empezará a formar la mielina compacta (Fig. 9,Ax₄) y desaparecerá gradualmente el citoplasma. La compactación de las vueltas del mesaxón tiene el efecto de formar las líneas intraperiodo y densa (Garbay y col., 2000).

Los principales factores que determinan el proceso de mielinización incluyen, - longitud del axón y un diámetro >1-2 μm (Garbay y col., 2000). La dependencia del diámetro, es característica distintiva del SNP; el SNC mieliniza fibras nerviosas más pequeñas (Peters y col., 1991; Garbay y col., 2000). Por otra parte, en cualquier nervio, los axones con mayor diámetro son los primeros que inician la mielinización, y tienen internodos más largos que los axones pequeños, los cuales adquieren la mielinización en forma tardía.

2.4 TIPOS Y FUNCIONES DE LAS FIBRAS NERVIOSAS

Al comparar el déficit neurológico que produce la sección de las raíces dorsales, y otros experimentos de sección nerviosa, con los cambios histológicos en los nervios, se han establecido las funciones y características histológicas de cada una de las familias de axones. En general; cuanto mayor es el diámetro de una fibra nerviosa, mayor es su velocidad de conducción. Los axones más gruesos participan sobre todo en la transmisión de sensaciones propioceptivas, en las funciones motoras somáticas, en la sensibilidad consciente al tacto y a la presión, mientras que los axones más delgados se ocupan de las sensaciones dolorosas y de la temperatura, así como de las funciones autónomas (Ganong, 1997). En la Tabla I, se enumeran los diversos tipos de fibras, sus diámetros, características eléctricas y funciones.

Tabla I. Tipos de fibras nerviosas en los nervios de los mamíferos*

<i>Tipo de fibra</i>	<i>Función</i>	<i>Diámetro de la fibra (μm)</i>	<i>Velocidad de conducción (m/seg)</i>	<i>Duración de la espiga (m/seg)</i>	<i>Periodo refractario absoluto (m/seg)</i>
$\text{A}\alpha$	<i>Propiocepción; cinestesia</i>	<i>12 a 20</i>	<i>70 a 120</i>	<i>0.4 a 0.5</i>	<i>0.4 a 1</i>
β	<i>Tacto, presión</i>	<i>5 a 12</i>	<i>30 a 70</i>		
γ	<i>Motora para los husos musculares</i>	<i>3 a 6</i>	<i>15 a 30</i>		
δ	<i>Dolor, frío, tacto</i>	<i>2 a 5</i>	<i>12 a 30</i>		
B	<i>Autónomas preganglionares</i>	<i><3</i>	<i>3 a 15</i>	<i>1.2</i>	<i>1.2</i>
<i>C Fibras de las raíces dorsales</i>	<i>Dolor temperatura, algo de mecanorrecepción, respuestas reflejas</i>	<i>0.4 a 1.2</i>	<i>0.5 a 2</i>	<i>2</i>	<i>2</i>
<i>Fibras simpáticas</i>	<i>Simpáticas posganglionares</i>	<i>0.3 a 1.3</i>	<i>0.7 a 2.3</i>	<i>2</i>	<i>2</i>

* *A y B son fibras mielinizadas y C, fibras no mielinizadas*

CAPITULO 3

CELULAS DEL SISTEMA NERVIOSO

El SN de los mamíferos está formado por neuronas que están sostenidas por algunas variedades de células no excitables, que en conjunto se denominan neuroglia (*neuro*=nervio; *glia*=pegamento); ellas, son más pequeñas que las neuronas y las superan de 5 a 10 veces en número (Dezawa, 2000); se reconocen 4 tipos: -*astrocitos, oligodendrocitos, microglia* y el *epéndimo*; aunque las CS de nervios periféricos (glia periférica), se han considerado como la quinta glia (Streit, 1999; Dezawa, 2000).

Por otra parte, han reconocido que la *glía envolvente del bulbo olfatorio (GE)* se asemeja a las CS por su capacidad de diferenciación, proliferación, promover la supervivencia neuronal y la neuritogénesis (Gudino-Cabrera y col., 2000). Sin embargo, al contrario de las CS, migran sin problemas en el SNC adulto, mezclándose con los astrocitos y otros tipos de glía central. Esta glía central similar a la GE y CS son los *tanicitos hipotalámicos, los pituicitos hipofisarios* y un tipo de *glía especial de la glándula pineal*; ésta glia central se ha denominado “aldainoglia” por sus propiedades promotoras del crecimiento axonal en lesiones consideradas no regenerativas (Verdu y col., 1999; Gudino-Cabrera y col., 2000).

Con excepción de las células de microglia, -de origen mesodérmico, el resto de células gliales, incluyendo las neuronas, provienen del ectodermo (Streit, 1999; Dezawa, 2000). Las neuronas se especializan en la integración y transmisión de impulsos nerviosos (Fig. 11 y 12); mientras que, las células gliales tienen diversas funciones; los astrocitos producen sustancias tróficas para las neuronas y ayudan a mantener la concentración apropiada de iones y neurotransmisores; la microglia actúa en la fagocitosis, sus funciones ordinarias son similares a los macrófagos tisulares; los oligodendrocitos participan en la formación de mielina en el tejido cerebral y su equivalente son las CS en nervios periféricos (Baulieu, 1997).

3.1 CARACTERÍSTICAS HISTOLÓGICAS DE LAS NEURONAS

El soma de forma multiangular, es la parte globular de una neurona, contiene el núcleo y los cuerpos de Nissl que son rodeados por el citoplasma; éste da origen a las prolongaciones de la célula (DeFelipe y col., 1991; Peters y col., 1991).

Típicamente, las neuronas tienen un núcleo largo y redondo, localizado en el centro del cuerpo celular, en neuronas pequeñas el núcleo ocupa casi la totalidad del cuerpo y en las grandes, flota libremente en el citoplasma; se distingue de otros núcleos por, - la ausencia de mitosis, elevada dilución de cromatina en grandes volúmenes nucleares, y el alto potencial de síntesis de proteínas (Peters y col., 1991). El núcleo está envuelto por la cisterna perinuclear (*membrana nuclear*), compuesta por dos capas de 7 nm, aquí, se identifican poros de 90 nm de diámetro y están relacionados con la actividad sintética (estado metabólico) de la célula (García-Segura, 1990), su función es separar el carioplasma del citoplasma y mantener el transporte activo y pasivo de sustancias. El *carioplasma* contiene la cromatina, ésta presenta distribución helicoidal y al aglomerarse desarrolla un patrón irregular (Peters y col., 1991; Jones 1999). Además, el núcleo contiene un *nucleolo* esférico que se tiñe profundamente y por micrografías electrónicas se identifica electro-denso; en células nerviosas de mamíferos, el diámetro promedio del nucleolo (3-7 μm) corresponde a una tercera o cuarta parte del núcleo. El nucleolo se subdivide en varios fragmentos y se asocian con bloques de heterocromatina (*pars granulosa* -ARN y *pars fibrosa* ARN+ADN), (Fig. 11), (Peters y col., 1991; Jones 1999).

Por otra parte, al teñir el citoplasma de neuronas con colorantes básicos (azul de toluidina, violeta de cresilo y azul de metileno) éste muestra un componente intensamente basófilico, conocido como *sustancia de Nissl*, tiene la forma de bloques romboides, alargados y separados unos a otros por un citoplasma brillante, es más notable en motoneuronas de medula espinal y cerebro (Fig. 12) (Peters y col., 1991; DeFelipe y col., 1991).

Aparentemente cada tipo de neurona tiene un patrón característico de la sustancia de Nissl, esto resulta útil para identificar cambios morfológicos y su estado metabólico (Peters y col., 1991; DeFelipe y col., 1991). Cuando el estado metabólico neuronal sufre un desequilibrio severo, -estimulación excesiva o interrupción del axón, las neuronas modifican el patrón de Nissl; proceso conocido como –

cromatolisis, descrito por primera vez por Nissl (1892,1894) en el núcleo motor del nervio facial (NMNF) de conejos lesionados por aplastamiento del nervio facial.

3.2 ULTRAESTRUCTURA DE CÉLULAS GLIALES (Astrocitos, oligodendrocitos y microglia)

3.2.1 Astrocitos

Con microscopía de luz, los astrocitos se reconocen como células en forma de estrella, sus prolongaciones se extienden dentro del neuropilo circundante; unas prolongaciones terminan en la superficie de los vasos sanguíneos (pie terminal) y otras se extienden a la superficie del SNC - membrana limitante glial, sobre la que forman expansiones terminales. En preparaciones de microscopía electrónica los criterios morfológicos que los distinguen son, la presencia de fibrillas intracitoplasmáticas y pies terminales sobre capilares sanguíneos y en la superficie cerebral. Estas células son susceptibles al edema y las primeras en edematizarse frente a un estímulo (Palay and Chan-Palay, 1974; Peters y col., 1991) (Fig. 13, a y b).

a) Astrocitos fibrosos: En preparaciones de microscopía electrónica, son las células gliales más brillantes de núcleo homogéneo en densidad, irregular y tienen forma de frijol (Fig. 13a,Nuc). El carioplasma presenta moderada densidad y ocasionalmente un nucleolo. Los abundantes filamentos citoplasmáticos (8 a 9 nm Ø), son los componentes más prominentes y distintivos, ocupan la mayoría del citoplasma y se extienden dentro de las prolongaciones citoplasmáticas (Fig. 13-a, AsP). Es característica de los filamentos intermedios la proteína ácida fibrilar glial (GFAP) y principal constituyente de los filamentos astrogliales (García-Segura 1996; Jones 1997). Los organelos citoplasmáticos aparecen dispersos, y con excepción de las mitocondrias, están confinados al pericarion, distribuidos por los filamentos (Fig. 13,a). *b) Astrocitos protoplasmáticos:* Poseen abundantes filamentos citoplasmáticos agrupados en fascículos, aunque en menor cantidad que los astrocitos fibrosos (Fig. 13,b), muestran un núcleo oval, redondo y homogéneo excepto por las condensaciones debajo de la cisterna perinuclear. Los organelos en el citoplasma son como en los astrocitos fibrosos (Peters y col., 1991) (Fig. 13-ab, AsP).

3.2.2 Oligodendrocitos

Por microscopía electrónica, los oligodendrocitos presentan mayor densidad en comparación al aspecto electro-lúcido que presentan los astrocitos (Fig. 13 y 14), el núcleo excéntrico presenta

diversas formas,- redondo, oval, irregular y la cromatina contenida en grumos (Fig. 14,a) (Peters y col., 1991). Se caracterizan por un citoplasma prominente, electro-denso y la presencia de abundantes gránulos y organelos muy desarrollados, aunque se destacan los microtúbulos (Peters y col., 1991). En variaciones de densidad citoplasmática y grumos de la cromatina nuclear, se distinguen tres tipos de oligodendrocitos, -el translúcido, medio y denso; sin embargo, tienden a ser más oscuros, pequeños y con mayor densidad citoplasmática y de cromatina, lo que puede confundirlos con facilidad con células de microglia (Peters y col., 1991).

3.2.3 Microglia

Fueron identificadas y caracterizadas por primera vez por del Río Hortega en 1920, son las más pequeñas de las células gliales (Ramírez-Expósito, 1999) (Fig. 14,b), su núcleo puede ser oval ó alargado, el nucleoplasma contiene grumos de cromatina dispersa y unida a la membrana nuclear, estas características pueden confundirlas con oligodendrocitos, sin embargo; los grumos de cromatina son más prominentes y ocupan una gran proporción del volumen nuclear (Peters y col., 1991; Ramírez-Expósito, 1999; Stoll, 1999).

La densidad del citoplasma es semejante a los oligodendrocitos, -contiene pocos microtúbulos y no presentan gránulos de glucógeno ni fascículos de filamentos como los astrocitos. Su característica más distintiva es la forma del retículo endoplásmico granular -la cisterna es larga y angosta como una cuerda (Fig.14,b RE), a diferencia de los oligodendrocitos, quienes presentan cisterna corta. (Fig. 14,a) (Peters y col., 1991; Ramírez-Expósito, 1999; Stoll, 1999).

3.3 NUCLEO Y NERVIO FACIAL

Distribución anatómica: El NMNF es parte del SNC y por lo tanto, su organización celular es similar a otras estructuras del SNC; está formado por dos tipos de células, -neuronas y células gliales y se localiza en la unión bulbo-protuberencial entre el cerebelo y el borde rostral del cuerpo trapezoide (Fig. 15,a) (Wang-Bennett, 1990).

En mamíferos (conejo, gato, mono), las fibras motoras que forman el nervio facial, se originan en el NMNF a partir de neuronas multipolares (Wang-Bennett, 1990; Jones 1997,1999; Suzuki, 1999; 2000), las sensitivas provienen del núcleo intermediario de Wrisberg, ambas ramas penetran al conducto

auditivo interno y corren a través del hueso temporal (región petrosa) por el acueducto de Falopio, hasta el forámen estilomastoideo (Dumitru, 1994; Ganong, 1997), de aquí; el nervio emerge, penetra a la glándula parótida y se ramifica en dos nervios principales: -el temporofacial y cervicofacial; la primera rama da origen a las ramas temporal y orbitaria; la segunda, a las ramas bucales, lingual, mandibular y cervical (Fig. 16) (Jones 1997,1999). De esta manera, las ramas faciales se distribuyen para inervar los diferentes músculos de la expresión facial (Dumitru, 1994). Las ramas periféricas bucales (superior e inferior) han sido las más estudiadas, por su localización anatómica y la importante participación en la expresividad facial (Spector y cols., 1991ab).

Cada grupo muscular de la cara está inervado por motoneuronas cuyos somas forman agrupamientos celulares en el NMNF (Fig. 15, b). La somatotopía y origen del NMNF varían en cada especie animal, -gato, conejo, rata y mono (Wang-Bennett, 1990; Jones 1997,1999); en ellos, se han distinguido los subnúcleos -lateral, intermedio, medial, dorsal y adicionalmente el ventral en el mono (Satoda, 1987; Wang-Bennett, 1990). En el conejo, los subnúcleos intermedio y lateral contienen los somas de las fibras que inervan la rama bucal superior (Wang-Bennett, 1990) (Fig. 15, b), ésta rama contiene un total de 4225 ± 1894 fibras, de las cuales el 92% (3876 ± 1572) son fibras mielinizadas, y el 8% restante (349 ± 322) son fibras no mielinizadas -sensitivas y autonómicas (Wang-Bennett, 1990; Spector y cols., 1991).

Descripción funcional: En los mamíferos el nervio facial es mixto, contiene *fibras motoras* que inervan los músculos de la cara y *fibras sensitivas* especiales de la gustación provenientes de la lengua, así como *fibras secretomotoras* del parasimpático para las glándulas salivales y lagrimal (Peters y cols., 1991; Spector y cols., 1991; Dezawa y cols., 2000). Las alteraciones en la motricidad y sensibilidad de la cara, están condicionadas por alguna alteración en la integridad de las diferentes áreas que recorre el nervio facial, desde su origen en el tallo cerebral (NMNF), hasta su distribución en los músculos faciales, cualquier trastorno degenerativo, traumático, tumoral etc., dentro de su trayectoria, se traduce en parálisis de los músculos que inervan la cara (Paparella, 1982; Spector y cols., 1991ab).

CAPITULO 4

ALTERACIONES EN EL SISTEMA NERVIOSO CENTRAL Y PERIFÉRICO, POSTERIOR A AXOTOMÍA

4.1 DEGENERACIÓN WALLERIANA

En 1850 Waller, describió los cambios morfológicos que se producen en el segmento nervioso distal en respuesta a lesión (sección), -mecanismos que se conocen como *degeneración Walleriana* (Chaundry y col., 1992; Bruck, 1997). Estos inician con desintegración de los componentes estructurales del citoesqueleto axonal (Chaundry y cols., 1992; Dumitru, 1994; Ganong, 1997) (Fig. 17).

La sección axónica interrumpe el aporte de información y nutrientes provenientes del soma, se produce pérdida del axoplasma y desintegración de organelos con fragmentación de membranas, hasta que solo queda una vaina de mielina con residuos del axón (Chaundry y cols., 1992; Bruck, 1997) (Fig. 17 y 18). Después sucede degeneración de mielina, se reduce la síntesis de lípidos y el contenido de ácido ribonucleico mensajero (ARNm) en CS, finalmente ocurre fragmentación de la vaina de mielina los detritus resultantes son fagocitados por macrófagos que invaden el nervio degenerado (Bruck, 1997).

Durante la degeneración, la membrana basal de la CS se mantiene intacta conteniendo las CS, así; en el segmento distal éstas células proliferan (mitosis) y originan las *bandas de Büngner* (cordones de CS) (Chaundry y cols., 1992; Bruck, 1997; Chandross, 1998) (Fig. 18,a). Mientras tanto, en el segmento proximal los axones dan origen a uno ó varios conos de crecimiento, éstos entran en las bandas de Büngner y forman las vías que conducirán a los axones regenerados hacia el órgano diana (Dezawa, 2000). En la etapa temprana, una CS envuelve varios axones regenerados, posteriormente son segregados a una relación 1:1, (CS/axón) para iniciar el proceso de mielinización (Chandross, 1998; Dezawa, 2000) (Fig. 8,9).

4.2 RESPUESTA RETRÓGRADA

4.2.1 Degeneración neuronal

La axotomía de motoneuronas periféricas, desencadena una intensa respuesta retrógrada en neuronas y células gliales (Svensson, 1993; Nakajima, 1996). En el NMNF, éstas células expresan cambios en la integridad citoesquelética, neurotransmisión, metabolismo, y expresión genética (Kreutzberg, 1995;

Jones, 1997), que conducen a la reorganización del NMNF. Los eventos morfológicos más importantes son: -modificaciones del volumen nuclear, número y tamaño de neuronas, organización en el número de sinapsis, y el curso temporal de eliminación de sinapsis redundantes (Yu, 1988; 1989).

Cromatolisis, cromatosíntesis: Después de 3 ó 4 días siguientes a la axotomía, el pericarion se hincha y el núcleo se vuelve excéntrico (Fig. 12,c), al mismo tiempo los cuerpos de Nissl empiezan a fragmentarse, se difunden en el citoplasma y el material basófilo se vuelve pálido. Al final de la *primera semana*, los cuerpos de Nissl aparecen marginados en la periferia del cuerpo celular. En este estadio, la célula puede morir y lisarse con la expulsión subsecuente de organelos (DeFelipe, 1991; Dumitru, 1994; Nakajima, 1996). Si la célula sobrevive, la recuperación se manifiesta, por la presencia de material basofílico coronando el polo del núcleo excéntrico (Jones, 1993). Mas tarde (*segunda semana*), se incrementa progresivamente la basofilia en el citoplasma, el núcleo regresa a su posición normal, se restablecen los cuerpos de Nissl en un periodo de 4 a 12 semanas. Durante este tiempo, la regeneración en el axón puede mantenerse activa; sin embargo el cuerpo celular neuronal aparenta haber recuperado su equilibrio (Kreutzberg, 1995; Jones, 1997).

Se han realizado diferentes estudios moleculares sobre la respuesta de motoneuronas axotomizadas, en relación con las diferencias sexuales y efectos de esteroides; en hembras la recuperación funcional de la parálisis facial inducida por aplastamiento es más rápida (Jones, 1993) al parecer por una diferente respuesta del sistema de polimerasa tipo I entre hembras y machos (Kinderman, 1993,1994). En hembras, la axotomía induce un incremento moderado en los niveles de ácido ribonucleico ribosomal (ARNr) mientras que en machos castrados éstos niveles se reducen y se incrementan nuevamente al restituir los niveles de testosterona. El incremento de la actividad metabólica neuronal se manifiesta por un incremento en el porcentaje de regeneración (Jones, 1997, 1999).

A pesar de estar bien documentado el fenómeno de muerte neuronal posterior a axotomía, se desconocen sus mecanismos o causas (Jones, 1993). En motoneuronas axotomizadas, se ha evidenciado que los esteroides gonadales andrógenos reducen la muerte neuronal, al actuar sobre receptores para andrógenos localizados en el núcleo celular y en los órganos diana (Yu, 1988, 1989; Jones, 1997,1999) al respecto; la administración de testosterona en hámsters machos, acelera la recuperación funcional de la parálisis facial inducida por aplastamiento del nervio facial, a nivel del foramen estilomastoideo (Kujawa, 1989; Jones, 1993,1997).

4.2.2 GLIOSIS

4.2.2.1 Astrocitosis reactiva

Durante el desarrollo del SNC, los astrocitos actúan como células de soporte para la migración neuronal y el crecimiento axónico (Steindler, 1993; García-Segura, 1996), al finalizar el crecimiento axonal, pierden la habilidad de soporte axónico y participan en la fisiología normal y patología del SN (Dezawa, 2000); es decir, en el recambio y metabolismo de neurotransmisores (Stoll, 1998, 1999), protegen a las neuronas de concentraciones elevadas de glutamato por los receptores que poseen en la membrana plasmática, para diversos neurotransmisores clásicos y neuropéptidos, -(dopamina, noradrenalina y serotonina) (Fawcett 1999; Dezawa, 2000).

En respuesta a los diferentes tipos de traumatismos, los astrocitos desencadenan una intensa respuesta astrocitaria conocida como “astrocitosis reactiva” -evento que consiste en el aumento del número (*hiperplasia*) y del tamaño de células (*hipertrofia*) que expresan proteína ácida fibrilar glial (\uparrow síntesis GFAP) (Fig. 19,ab) (Jones, 1997; Morin-Richaud, 1998; Stoll, 1998, 1999; Fawcett, 1999). Esta proteína estructural es un componente del citoesqueleto astrocitario que ha sido ampliamente utilizada para la identificación inmunocitoquímica de astrocitos, su incremento se considera un signo de activación astrogliar (Jones, 1997, 1999; Morin-Richaud, 1998; Dezawa, 2000).

Estos cambios fenotípicos que sufren los astrocitos reactivos (hiperplasia, \uparrow volumen por edema, endocitosis, migración ameboide) (Fawcett, 1999), reflejan un importante aumento metabólico y de síntesis de proteínas en respuesta al incremento de sus demandas fisiológicas, como un mecanismo compensatorio para la reparación del daño tisular (García-Segura, 1996; Stoll, 1998, 1999).

La reactividad astrogliar, además de elevar la síntesis de GFAP, expresa varias clases de moléculas que actúan modulando la cicatriz glial, -como los factores neurotróficos (factor de crecimiento nervioso (NGF), factor de crecimiento I similar a la insulina (IGF-I), factor transformador del crecimiento (TGF β), factor de crecimiento de fibroblastos (FGF), factor neurotrófico ciliar (CNTF), citocinas, moléculas de adhesión celular (CAMs) (Ridet y col., 1997; Kirsch y col., 1998; Dezawa, 1997, 2000) y las moléculas de matriz extracelular (tenacina, laminina y proteoglicanos) involucradas en la mediación de la elongación axonal, a excepción de los proteoglicanos condroitin y el sulfato de keratina, que la inhiben (Dezawa, 1997, 2000).

El metabolismo enzimático, también es modificado por los astrocitos activados, -se incrementa la actividad de la enzima oxidoreductasa, la producción de proteasas e inhibidores de las

mismas. Se ha propuesto que, estas enzimas inducen el desarrollo de la gliosis reactiva y la patogénesis de los trastornos neurodegenerativos (Fawcett, 1999; Dezawa, 2000), además; las proteasas permiten a los astrocitos remodelar la matriz extracelular en los sitios de lesión neuronal y eliminar detritus celulares (Stoll, 1998, 1999).

Por una parte, la cicatriz glial evita la difusión de citotoxinas, excluye la penetración de células no neurales al parénquima cerebral y contribuye a rellenar la pérdida de tejido (Stoll, 1998,1999) (Fig. 19,ab). No es posible afirmar si la participación astrocitaria producirá efectos benéficos o perjudiciales para la posterior reparación de daño (Fawcett, 1999). A este respecto; se ha propuesto que la cicatriz glial podría inhibir el rebrote de neuritas (Dezawa, 2000), así; el crecimiento de axones en regeneración, se bloquea en la vecindad inmediata de los astrocitos reactivos (Fawcett, 1999; Dezawa, 2000), por moléculas que inhiben la extensión de neuritas (Kirsch y col., 1998), eventos desfavorables en la regeneración. Por otra parte, se ha demostrado que la reactividad glial transitoriamente expresa efectos benéficos en los crecimientos axónicos (Ramírez Expósito, 1999), ya que por lo menos en algunas situaciones experimentales promueven la supervivencia neuronal y crecimiento neurítico (Eddleston y Mucke, 1993).

La activación astrocitaria se ha estudiado en diferentes especies animales, -ratas, conejos, lobos etc., utilizando distintas clases de lesión (aplastamiento ó sección), nervios y sus núcleos -facial, óptico; y ha sido evaluada mediante estudios inmunocitoquímicos de GFAP y bromodeoxiuridina (BrdU), microscopía electrónica y técnicas moleculares; ---independientemente de la especie, el tipo de lesión y la clase de nervio, la astrogliosis se manifiesta por hiperplasia e hipertrofia (Nakajima, 1996).

En particular, el nervio facial es uno de los nervios mas estudiados y lesionados (sección ó aplastamiento) en la emergencia estilomastoidea, éste responde en el NMNF con una intensa activación glial (\uparrow ARNm para GFAP en astrocitos) al segundo día después de la axotomía y permanecen elevados durante dos semanas (Jones, 1997, 1999); además, en preparaciones de microscopía electrónica los astrocitos se distinguen por *núcleos mayores que los normales*, abundantes cuerpos densos, fragmentos de mielina y depósitos de lípidos; éstas observaciones sugieren que pueden actuar como fagocitos primarios en la regeneración nerviosa (Peters y col., 1991; Jones, 1999).

4.2.2.2 Microglia reactiva

Las células microgliales representan del 5 al 15% del total de las células cerebrales y se identifican a nivel, -perivascular, interfascicular y perineuronal (Ramírez-Expósito, 1999). En condiciones fisiológicas, están implicadas en la fagocitosis (*macrófagos cerebrales*), producción de factores

neurotróficos y presentación de antígenos; en respuesta a estímulos, -tienen un papel citotóxico por la liberación de radicales libres y neurotoxinas (Streit, 1999; Fawcett, 1999; Stoll, 1999).

En trastornos degenerativos, traumáticos ó inflamatorios, las células de microglia se activan, y desencadenan una cascada de eventos caracterizados por -proliferación, migración al sitio del daño y presentación de varios estados morfológicos (*microglia ameboide, ramificada, activada y reactiva*) relacionados con la capacidad fagocítica y sus funciones (Fig. 20 a,b) (Gibson, 1979; Boya, 1987;1991; Ramírez-Expósito, 1999; Dezawa; 2000). Eventos demostrados en el núcleo facial de motoneuronas seccionadas de ratas y lobos (Ramírez-Expósito, 1999; Streit, 1999).

En el primer estadio de activación -estado no-fagocítico (*microglia ramificada*), -la microglia se hipertrofia y expresa varios receptores CR3, CD43 y antígenos de la clase I y II del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC), factor de necrosis tumoral (TNF α) y en algunas ocasiones TNF β (Kiefer y col., 1993; Butini y col, 1996; Dezawa, 2000). En el segundo estadio, la *microglia activada* presenta un carácter fagocítico parcial, funciona como precursora de la microglia reactiva y se relaciona con mecanismos inmunes (Ramírez-Expósito, 1999; Dezawa, 2000). La *microglia reactiva*, presenta una morfología similar a la *ameboidea*, tiene el carácter de macrófago activo, -fagocitan células degeneradas; y se ha relacionado con la regulación de la astrogliosis que tiene lugar durante la formación de la cicatriz glial, posterior a lesiones traumáticas (Graeber, 1998; Fawcett, 1999; Jimeno, 1999).

Durante la activación microglial se desarrolla una respuesta bimodal, -actúan como depuradores, remueven los detritus celulares, liberan sustancias citotóxicas que son potencialmente dañinas (Banati y col., 1993; Kreutzberg, 1996) y liberan citocinas que interactúan con otras células no neuronales, para propiciar un ambiente benéfico y promover la regeneración (Moore y Thanos, 1996; Prewitt y cols., 1997; Ramírez-Expósito, 1999; Stoll, 1999; Dezawa, 2000).

CAPITULO 5

REPARACIÓN QUIRURGICA EN NERVIOS PERIFÉRICOS

5.1 HISTORIA DE LA REPARACIÓN NERVIOSA

El interés en la reparación de nervios periféricos se remota a 1800 años, con Galeno en el año 200 DC. al hablar de la posibilidad de la regeneración nerviosa (Terris y col, 1993). Paul de Argina en el año 600 DC. con la utilización de suturas realizó la primera aproximación de segmentos nerviosos,

técnica quirúrgica conocida como “*neurorrafia ó reparación termino-terminal*” (Paparella, 1982) (Fig. 21,a).

Más tarde, la imposibilidad de unir los segmentos por pérdida del tejido nervioso, y las secuelas resultantes de una aproximación forzosa, (tensión sostenida, necrosis y disfunción), en 1947, condujeron a Seddon al recurso quirúrgico de implantación, -el “*injerto nervioso*”, aunque sujeto de donación, éste permite eliminar la tensión nerviosa y reconstruir defectos nerviosos mayores de 5 mm (Terris y col, 1993) (Fig. 21,b). Desde que empezó su aplicación, se han utilizado injertos, -simples ó compuestos (vascularizados, musculares)(Hall;1997); provenientes de la misma especie (homólogos) ó de otra especie distinta al receptor (heterólogos); sin embargo, los mejores resultados se han obtenido con autoinjertos simples (Amillo, 1995; Lawson, 1998). Posteriormente, con la introducción del microscopio quirúrgico y el desarrollo de la microcirugía (Smith, 1964), se desarrollaron nuevas técnicas de reparación nerviosa, -la *interfascicular* y *fascicular*, introducidas por Langley, Hashimoto y Millesi en 1972, que consisten en la aproximación mediante sutura de los fascículos y fibras nerviosas (Terris y col, 1993) (Fig. 21,b’).

No obstante, con los refinamientos quirúrgicos obtenidos con técnicas convencionales, han surgido problemas relacionados con la alineación y coaptación fascicular y las complicaciones disfuncionales resultantes, -*neuomas* y *regeneración aberrante*, entre las más sobresalientes (Fig. 22) (Grant, 1999).

Con este panorama, y con el propósito de lograr una reparación nerviosa más eficiente, con técnicas que permitan reducir el traumatismo de los elementos nerviosos, se introdujeron las “*cámaras axónicas*” por Buengner en 1891, técnica conocida como “*tubulización*”, (Fig. 21,c). (Strauch, 2000). A partir de entonces, los estudios con nervios tubulizados han permitido investigar los eventos moleculares y celulares, implicados en la regeneración nerviosa (Lundborg y col., 1982, 1994; Min-Sheng y col., 1995). En la actualidad, ésta técnica se estudia a nivel experimental, como sustituto del injerto nervioso (Spector, 1991, 1992; Terris y col. 1993, Grant, 1999).

5.2 REPARACIÓN NERVIOSA MEDIANTE TUBULIZACIÓN

Las cámaras axónicas, -conocidas también como cámaras de regeneración, tubulización, guías nerviosas y prótesis, son estructuras cilíndricas, huecas, compuestas de material endógeno (venas,

arterias) y exógeno (sintéticos y biodegradables). En ellos, se introducen los extremos del nervio seccionado, para promover su regeneración (Wong, 1991; Terris y col., 1993) (Fig. 21,c).

Las cámaras ofrecen notables ventajas, -adecuada coaptación, sostén mecánico, reducen el traumatismo quirúrgico y el número de puntos de sutura (Spector y col., 1993; Strauch, 2000). Actúan como un ducto de orientación para el crecimiento de axones y mantienen la comunicación química entre los extremos proximal y distal del nervio seccionado, permiten que se concentren los factores tróficos y mitógenos, naturalmente producidos por los tejidos lesionados (Varon, 1993; Spector y col., 1993), -favorecen la aplicación “*in situ*” de diversos compuestos para promover la regeneración (Strauch, 2000). Por otra parte, la cámara dirige el crecimiento longitudinal de los elementos neurales, reduce la pérdida de fibras en el órgano diana y limita el crecimiento de elementos no nerviosos hacia el interior del nervio, que pueden impedir el crecimiento axónico (Spector y col., 1991,1993) (Fig. 22).

5.2.1 Cámaras axónicas de materiales biológicos y no biológicos

Los primeros materiales utilizados como cámaras de crecimiento axónico incluyeron tubos de gelatina, agar, obteniéndose resultados deficientes (Strauch, 2000). Más tarde, después de la segunda Guerra Mundial se utilizaron *materiales sintéticos* como; silicona (Spector y col., 1991ab, 1992, 1993), polietileno (den Dunnen, 1996), Gortex (Terris y col., 1993), millipore (Campbell y col., 1961), surgicel (Gabrielson y col., 1996), de todos ellos, la silicona fue la más utilizada por ser inerte, elástica y transparente (Spector y col., 1991).

Al inicio de 1980, Lundborg y col., utilizando cámaras de silicona, demostraron la ausencia de regeneración nerviosa en defectos nerviosos superiores a 15 mm de longitud, utilizados en distintos nervios de modelos animales (ciático, facial) (Spector y col., 1991ab, 1992, 1993) y seres humanos (mediano y digitales) (Lundborg, 1994). Más tarde, se hicieron evidentes algunos problemas como compresión nerviosa crónica, irritación y fibrosis, eventos que finalmente comprometieron la función neural y permeabilidad al oxígeno y otros nutrientes, hacia el interior de la cámara de silicona (den Dunnen, 1993;1996, Gilchrist y col., 1998; Strauch, 2000).

Una estrategia ideal para resolver esos problemas, fue a través de la “*ingeniería tisular*”, cuyo objetivo es regenerar tejidos y crear substitutos biológicos (tejidos y órganos bio-artificiales), mediante la utilización de *biomateriales* con la adición de células, genes o factores de crecimiento. (Angelova, 1999; Hubbell, 1999; Tabata, 2000). Así, en 1983, Molander y cols., empezaron a utilizar cámaras

axónicas biodegradables, solas y en combinación con células y sustancias neurotróficas y con ello, se lograron reparaciones exitosas de defectos nerviosos mayores de 1 hasta 5 cm, en animales mayores que los roedores (ciático de la rata y gato, facial en conejos y ovejas) con resultados funcionales que no se lograron con materiales sintéticos (Hadlock y col., 1998; Suzuki, 1999; 2000; Strauch, 2000). Entre los polímeros sintéticos utilizados se encuentran, ácido-poli-láctido (PLA), ácido-poli-glicólico (PGA), polifosfazenos, y sus copolímeros (den dunnen, 1993; 1996; 2000; Langone, 1995; Evans, 1999) y el polímero natural, -alginate (Suzuki, 1999; 2000).

Con el uso de los biomateriales, no solamente se busca que sean antigénicamente inertes (biocompatibles), sino que además tengan un comportamiento bioactivo en los tejidos (Hubell, 1999); es decir, que sufran una biodegradación gradual controlable, para que actúen como sustrato físico en los crecimientos nerviosos y ejerzan efectos biológicos al actuar como vehículo de liberación prolongada, -entre las principales ventajas (Hadlock, 1999; Steuer, 1999; Hadlock, 2000; Yasuhiko, 2000). Esta biotecnología, permite en el sitio de acción, la liberación constante y regular del compuesto, evita la aplicación repetida de sustancias y los efectos secundarios indeseables de una terapia sistémica (Angelova, 1999; Hubbell, 1999; Tabata, 2000). Actualmente éstos biomateriales se están evaluando como posibles vectores para transferencia génica (Tabata, 2000).

5.2.2 Quitosana

Recientemente ha surgido interés en estudiar las posibles aplicaciones biomédicas de la quitosana [poli(1-4)- β -D-glucosamina], biopolímero resultante de la N-desacetilación de la quitina [poli(1-4)- β -acetoamino 2-deoxy-D-glucosa] (Kas, 1997)(Fig. 23). La quitina está presente en gran cantidad, en el caparazón de invertebrados marinos (Sheperd y col., 1997) y en menor cantidad en el tallo de plantas, hongos, insectos y moluscos (Sheperd y col., 1997; Kas, 1997). Sin embargo; por la abundancia de exoesqueletos disponibles como desechos de alimentos, la quitosana es principalmente manufacturada a partir de crustáceos, ella puede fabricarse para obtener diferentes formas físicas; -solución, hojuelas, polvo, gotas, fibras (Sheperd y col., 1997).

Fig. 23 Estructura química de la quitosana y quitina.

<i>QUIMICAS</i>	<i>BIOLOGICAS</i>
<i>Poliamina catiónica</i>	<i>Biocompatibilidad</i>
<i>elevada carga en densidades pHs < 6.5</i>	<i>polímero natural</i>
<i>adhiera a superficies con carga negativa</i>	<i>biodegradable</i>
<i>forma geles con polianiones</i>	<i>segura, no tóxica</i>
<i>↑ peso molecular en polielectrolitos lineales</i>	<i>Hemostática</i>
<i>viscosidad, alta-baja</i>	<i>Bacteriostática</i>
<i>Quelante de algunos metales de transición</i>	<i>Fungistática</i>
<i>Asequible a modificación química</i>	<i>Espermicida</i>
<i>reactiva a grupos amino/hidroxy</i>	<i>Anticancerígena</i>
	<i>Anticolesterolémica</i>

^(a) Kas HS, 1997

Este mismo biomaterial tiene una amplia aplicación en la industria, especialmente en productos agrícolas, alimentos, cosméticos y productos farmacéuticos, en ésta última, por su capacidad como vehículo para liberar sustancias (Jamella, 1995; 1998). A pesar de que la quitosana ha tenido múltiples aplicaciones en el área biomédica, hasta el presente no ha sido empleada en la reparación de lesiones nerviosas, como cámara de crecimiento axónico.

5.3.2 Respuesta inmune a implantes

El organismo reacciona frente a las agresiones externas (implantes) por una serie de manifestaciones generales e inespecíficas de la respuesta inflamatoria, en cuya génesis intervienen fundamentalmente las interleucinas -1 y 6 (IL-1, IL-6) y la tenacina (TNX) (Mateos-Rodríguez, 1998). La reacción inflamatoria en el sitio de lesión, puede ser paroxística o leve, dependiendo de las propiedades físico-químicas del polímero (Anderson, 1998).

La inflamación leve ó moderada pueden producir efectos benéficos cuando sucede reabsorción del polímero; pero, cuando la inflamación es severa, se producen cantidades excesivas de agentes hidrolizantes y oxidantes por células inflamatorias, que finalmente rechazan el implante y destruyen el tejido que los rodea (Tomihata, 1996; Regueiro, 1997; Mateos-Rodríguez, 1998). Las manifestaciones locales de inflamación están constituidas por los 5 síntomas y signos clásicos: calor, rubor, tumor, dolor e impotencia funcional y puede añadirse la aparición de pus (Remes, 1992; Mateos-Rodríguez, 1998). Esta acción resulta de la fagocitosis (mecanismo de defensa inespecífico) y se lleva a cabo por diferentes tipos celulares, pero principalmente neutrófilos y macrófagos, éstos últimos intervienen en todos los estadios de la respuesta inmunitaria (Regueiro, 1997).

Inicialmente, los macrófagos actúan rápidamente como mecanismo protector para responder antes de la amplificación mediada por los linfocitos T, intervienen en el inicio de la activación de los linfocitos T mediante el procesamiento y la presentación de antígenos y finalmente son importantes componentes de la fase efectora de la respuesta mediada por células, en calidad de células inflamatorias, tumoricidas y microbicidas (Segura-Egea, 1998).

Cuando se activan los linfocitos T cooperadores (LTh), se producen las citocinas IL2 y el interferón γ (IFN γ) y activan los macrófagos provocando: a) inflamación y fiebre a través de las citocinas (IL-1, IL-6, TNF α), b) activación linfocitaria: IL-1 y presentación del antígeno, c) reorganización tisular a través de factores solubles (elastasa, colagenasa, hialuronidasa), d) daño tisular (TNF α , H₂O₂, hidrolasas), e) Actividad tumoricida, por contacto celular o por factores tóxicos o citocinas, f) Actividad microbicida, aumenta por un doble mecanismo de atracción (Regueiro, 1997; Anderson, 1998; Mateos-Rodríguez, 1998; Segura-Egea, 1998).

Existen diversos pasos en el proceso de fagocitosis: a) quimiotaxis (citocinas, C5a, C3a), b) unión del fagocito al microorganismo mediada por lectinas, C3b, C4b y Ac, c) ingestión (fagosoma-lisosoma). Una vez interiorizados los microorganismos, se activan mecanismos destructivos: 1) intermediarios reactivos del oxígeno (radicales hidroxilo-OH, oxígeno único, peróxido de hidrógeno), 2) intermediarios reactivos del nitrógeno, -óxido nítrico (ON), 3) proteínas catiónicas (Tomihata, 1996; Regueiro, 1997; Anderson, 1998).

Por otra parte, se distinguen reacciones de rechazo del huésped contra el injerto y viceversa, éstas resultan de interacción con linfocitos ya sensibilizados contra antígenos específicos (Reacción

tipo IV) (Segura-Egea, 1998). La reacción del huésped contra el injerto es la más habitual y puede ser de 3 tipos: a) rechazo hiperagudo –se produce en horas post-transplante, b) rechazo agudo o acelerado, suele ocurrir dentro de los primeros 30 días post-transplante, c) rechazo crónico –ocurre pérdida paulatina de la función del injerto en meses o años. En estas circunstancias, los linfocitos activados provocan migración de macrófagos y mononucleares al sitio de la inflamación aumentando la respuesta y el daño tisular (Remes, 1992; Anderson, 1998).

Virtualmente, cada individuo en algún momento de su vida puede llegar a estar en contacto con diversos biomateriales. La implantación puede ser permanente o transitoria. Motivos que obligan a evaluar la seguridad y efectividad de cada biomaterial, considerando un balance de riesgo y beneficio. De cada biomaterial, se deben analizar los cambios biológicos y dinámicos que ocurren en la interfase material/tejido; éstos incluyen estudios moleculares y celulares *in vivo* e *in vitro* de la respuesta inflamatoria crónica y aguda y la relación de la respuesta obtenida a largo plazo, para determinar el éxito o el fracaso del biomaterial. Así, como parte del conocimiento fundamental se requiere un análisis más exhaustivo en áreas como infección, respuesta inmune y las características de la reacción tisular en las interfases de gas/fluidos/sangre. Además, debe definirse antes de las aplicaciones en humanos, los criterios de elección en modelos animales (Angelova, 2000; Tabata, 2000).

CAPITULO 6

NEUROESTROIDES

6.1 DEFINICION Y BIOSÍNTESIS

El término “*neuroesteroide*” no designa una clase particular de esteroides, solamente se refiere al sitio de síntesis –“*sistema nervioso*” (Baulieu, 1996, 2000); son compuestos sintetizados por células gliales en el cerebro y nervios periféricos, independientemente de la actividad glandular periférica (Baulieu 1997). La progesterona, hormona producida y secretada por ovarios y glándulas

adrenales, se considerará neuroesteroide, si la síntesis se realiza “de novo” en el cerebro ó nervios periféricos (Baulieu, 1997).

En estudios realizados en el cerebro de ratas, se observó que los *astrocitos* y *oligodendrocitos* sintetizan y metabolizan neuroesteroides (Baulieu, 1990; Robel y col., 1995a), lo mismo sucedió con las CS del SNP –sintetizan progesterona (PROG) a partir de pregnenolona (PREG), independientemente de la edad y del sexo (Jung-Testas y col., 1996; Koenig y col., 1995;2000; Baulieu, 2000) (Fig. 24). En cambio, hasta el momento no se ha demostrado la síntesis de pregnenolona en neuronas (Baulieu y col., 1997).

La esteroidogénesis se inicia con la conversión de colesterol a PREG, mediada por la enzima citocromo P450_{scc} en la membrana interna mitocondrial de astrocitos y oligodendrocitos (Fig. 24), evento enzimático característico de las células esteroidogénicas en glándulas endocrinas, incluyendo -testículos, ovarios y glándulas adrenales. La PREG es el principal precursor de la síntesis de hormonas esteroides a partir de colesterol en células glandulares esteroideogénicas y “de novo” en el tejido nervioso (Baulieu, 1996,1997; Engel, 2001), a partir de ella se origina la PROG y dehidroepiandrosterona (DHA); luego la serie completa de esteroides (Robel y col., 1995a Baulieu, 1997; Friess, 2000) (Fig.16).

6.2 SIGNIFICANCIA BIOLÓGICA DE LOS NEUROESTEROIDES

La PREG, PROG y sus metabolitos reducidos, son los únicos esteroides que pueden ser producidos *de novo* a partir de colesterol en el tejido cerebral (Baulieu y col., 2000), se desconoce el estímulo fisiológico que regula su síntesis, es probable que actúen a través de segundos mensajeros o factores tróficos, como sucede en órganos esteroidogénicos clásicos que estimulan la biosíntesis de esteroides (Baulieu, 1995); también se desconocen los mecanismos de acción neuro-reparativos y poco se conoce acerca del metabolismo de regulación, sin embargo; son esenciales para las funciones del sistema nervioso (Baulieu, 1990, 2000; Schumacher, 1999). Posiblemente, la síntesis local permita mantener niveles más estables, ejerciendo a la vez una función protectora en el tejido cerebral. Los reducidos niveles circulantes de PREG y PROG durante las etapas del ciclo estral, vejez y los encontrados en el SN de machos, pueden explicar la dependencia de una síntesis local (Baulieu y col., 1997).

Los neuroesteroides, tienen efectos específicos moduladores sobre receptores ionotrópicos: -inhiben al receptor nicotínico neuronal de acetilcolina (Baulieu, 1995, 2000; Zorumski, 2000), activan los receptores hipotalámicos de oxitocina (Robel y col., 1995b), mientras que; el metabolito reducido $5\alpha,3\alpha$, activa la $3\alpha,5\alpha$ TH-progesterona y éste último, los canales de cloro del complejo receptor GABA_A

(Baulieu y col., 1996,1997, 2000; Engel, 2001) (Fig. 25) además activa, -glicina y glutamato y por lo tanto; modulan la excitabilidad neuronal (Robel y col., 1995b, del Cerro y col., 1995; Baulieu y col., 1997; Engel, 2001).

Por otra parte, los neuroesteroides ejercen distintos efectos neurotróficos, particularmente durante el desarrollo temprano y en la vida adulta. *In vitro*, regulan el crecimiento y diferenciación de astrogliá (Jung-Testas y col., 1994; del Cerro y col., 1995). Mediante mecanismos autocrinos-paracrinos modulan la respuesta reparativa, al ejercer efectos tróficos en neuronas y células gliales, mediante la inhibición de la cicatriz glial y la sobrevivencia de neuronas (del Cerro y col., 1995; García-Estrada y col., 1998; Baulieu, 1997, 2000).

Cuando se adicionan a medios de cultivos, los neuroesteroides favorecen la sobrevivencia neuronal (Baulieu, 1997) y elevan la síntesis de proteínas de mielina específica de oligodendrocitos-proteína básica de mielina (MBP) y el nucleótido cíclico fosfodiesterasa (CNPasa) (Jung-Testas y col., 1994; Desernaud, 1998, Baulieu, 2000). En el SNP de roedores machos, la PROG estimula la regeneración nerviosa al acelerar la maduración de axones regenerados e incrementar la formación de vainas de mielina (Koenig y col., 1995, 2000). En términos generales, puede decirse que los neuroesteroides actúan mediante mecanismos de acción genómicos y no-genómicos y a través de una regulación autocrina-paracrina entre neuronas y células gliales (Fig. 25) (Robel y Baulieu 1995, Baulieu y col., 1997, 2000; Schumacher, 1999).

6.3 SINTESIS DE NEUROESTEROIDES POR CÉLULAS DE SCHWANN

Al detectarse concentraciones elevadas de PREG en el nervio ciático humano, se confirmó la síntesis de este compuesto en nervios periféricos (Morfin y col., 1992). Mas tarde, en el nervio ciático de ratas, se registraron concentraciones de PROG y PREG 10 veces mayores que en plasma (~10 ng/g), niveles que no se redujeron con la extirpación de gónadas y glándulas adrenales (Koenig y col., 1995; Baulieu 1996,1997).

Por otra parte, estudios *in vitro* demostraron que las neuronas inducen la vía biosintética de PROG en las CS, al verificar que al cultivarlas previamente con neuronas ganglionares de la raíz dorsal (DRG), contenían la enzima 3β -HSD, que convierte PREG a PROG (Baulieu y col., 1997). Estos resultados demostraron que las CS sintetizan neuroesteroides, incluyendo PREG, PROG y sus metabolitos reducidos (Koenig, 2000).

La PROG regula las funciones de las CS mediante mecanismos autocrinos (Baulieu, 2000; Engel, 2001) y además de sintetizar PROG, también expresan el receptor intracelular para ese neuroesteroide (R-progesterona), como ha sido demostrado por la unión de ligandos selectivos en la RT-PCR,

utilizando iniciadores complementarios de ligandos, que se unen a los dominios de los R-progesterona de la rata (Baulieu y col., 1997, 2000; Zorumski, 2000).

6.4 PROMOCION DE MIELINIZACIÓN POR PROGESTERONA

La PROG y su precursor PREG se encuentran en concentraciones elevadas en el SNP y las CS, -glia mielinizante de nervios periféricos, sintetizan PROG a partir de PREG (Koenig y col., 1995,2000; Baulieu y col., 1996,2000; Desarnaud y col., 1998). En el nervio ciático de ratones machos, se demostró la síntesis endógena de PROG por CS, independiente de la actividad gonadal y adrenal y se demostró el efecto *in vivo* de PROG sobre la mielinización en el nervio ciático de ratones lesionados por congelación (Koenig y col., 1995, 2000), éstos resultados confirmaron la síntesis de PROG por CS y el efecto sobre la síntesis de mielina durante la regeneración nerviosa (Koenig y col., 1995,2000; Zorumski, 2000).

La PROG promueve la mielinización al activar los genes específicos de proteínas de mielina, -proteína cero (Po) y la proteína de mielina periférica-22 (PMP22), elementales en la síntesis de mielina en nervios periféricos (Garbay y col., 2000). El gen PMP22 contiene los exones 1A y 1B, cada uno da origen a dos transcripciones: el exon 1A, confinado al SNP que se acopla estrechamente en la formación de mielina durante el desarrollo nervioso y regeneración; el exon 1B- confinado al tejido no neural y fibroblastos (Suter y Snipes, 1995; Desarnaud, 1998). Así, el PMP22 actúa en dos sitios biológicos: - uno relacionado al crecimiento axonal (1B) y el (1A) en la mielinización (Desarnaud y col., 1998).

En las CS, la PROG eleva específica y selectivamente las actividades del promotor Po y el promotor 1 (exon 1A) de la PMP22, ambos promotores están implicados en la formación de mielina (Desarnaud y col., 1998). La PROG puede actuar a nivel transcripcional elevando específicamente la expresión de genes específicos de proteínas de mielina, mecanismo demostrado por la concentración elevada del RNA de la proteína básica de mielina en las CS (Melcangi y col., 1998, 2000). De esta manera, la PROG, es sintetizada localmente en el SNP por las CS, y promueve la mielinización al actuar como un factor autocrino (Baulieu y col., 1996, 1997, 2000; Desarnaud y col., 1998, Koenig, 2000).

6.5 NEUROESTEROIDES EN GLIOSIS REACTIVA

Las lesiones del SNC activan las células gliales que contribuyen a la formación de la *cicatriz glial*, cuya presencia resulta desfavorable en la regeneración y remielinización axonal (Fawcett y col., 1999). En la gliosis reactiva intervienen células de microglia, astrocitos, precursores de oligodendrocitos y células meníngeas; en conjunto producen moléculas inhibitorias para la

regeneración axonal (Fawcett y col., 1999; Streit y col., 1999). Esta respuesta glial, es modulada por hormonas gonadales, neuroesteroides y otras sustancias extracerebrales provenientes de la circulación sistémica (García-Segura y col., 1994; García-Estrada y col., 1998).

Las células gliales expresan receptores para hormonas gonadales (Jung-Testas y col., 1996; Baulieu, 2000; Engel, 2001) y son capaces de inhibir la gliosis post-traumática cerebral, -la administración sistémica de testosterona en ratas machos, inhibe la proliferación de astrogliosis en la corteza cerebral y el hipocampo lesionado por una herida penetrante; en hámsters machos ésta hormona inhibe los niveles de ARNm para GFAP en el NMNF lesionado por aplastamiento del nervio facial, en la salida del foramen estilomastoideo (Jones y col., 1996,1997). Además, en ratas hembras, el 17β -estradiol y PROG tienen efectos similares (García-Estrada y col., 1993).

Estudios *in vivo* e *in vitro* demostraron que los neuroesteroides -PREG, PROG ó DHA, reducen la gliosis reactiva en el tejido cerebral de ratas machos, ésto indica que la producción cerebral de neuroesteroides, contribuye en la respuesta regenerativa y en los mecanismos de reparación cerebral modulada por astrogliosis, sin embargo, de los neuroesteroides estudiados en tejido cerebral, la DHA fue el inhibidor más potente de la proliferación astrogliosis (Jones, 1996; Garcia-Estrada y col., 1998; Friess, 2000).

Se tiene gran interés en conocer el mecanismo de regulación de gliosis reactiva por neuroesteroides, debido que el tejido glial en el SNC de mamíferos ha sido considerado como uno de los principales, para que suceda la regeneración axonal (Le Roux y col., 1996). Por su parte, la cicatriz glial forma una barrera física que evita el crecimiento axonal y producen varias moléculas como los proteoglicanos, que inhiben el crecimiento neurítico central (Bovolenta y col., 1992; Le Roux y col., 1996). Los resultados favorables de los neuroesteroides al inhibir la cicatriz glial, pueden proponerse para facilitar la regeneración axonal del SNC (Del Cerro y col., 1995; García-Estrada y col., 1998), en particular, en la reparación de nervios periféricos.

CAPITULO 7

REGENERACIÓN NERVIOSA

7.1 ESTADIOS REGENERATIVOS EN NERVIOS TUBULIZADOS

Fields y cols. en 1989 (den Dunnen, 1996) describieron 5 estadios regenerativos que suceden después de la tubulización de nervios periféricos:

Respuesta Postraumática - Se caracteriza por la exudación de líquido acelular en la cámara axónica (Wong y col., 1991), la mayor parte es suero y en cantidad variable, -sangre, líquido extracelular y detritus citoplasmáticos intracelulares, incluyendo organelos intracitoplasmáticos como membranas del retículo endoplásmico, todos provenientes de ambos extremos nerviosos (proximal y distal) (Spector y col, 1991; den Dunnen, 1996). En esta *matriz líquida*, están presentes factores neurotróficos y promotores de neuritas que favorecen el crecimiento celular, migración, mitogénesis y elongación (Strauch, 2000) (Fig. 26,a).

Migración celular y prolongaciones celulares –Aquí, crecen células mesodérmicas, sobre todo fibroblastos perineurales procedentes de ambos extremos nerviosos, sus prolongaciones se extienden a través de la matriz y actúan como soporte estructural para orientar la migración de axones y SC, al mismo tiempo migran macrófagos y fagocitan eritrocitos y otros remanentes tisulares, en ambos segmentos nerviosos (DeFelipe y col., 1993; Bailey y col, 1993) (Fig. 26,a-c).

Diferenciación de elementos vasculares, neuronales y gliales- las bandas de fibrina y colágena forman vías para el rebrote de neuritas y contribuyen a organizar el epineurio primitivo (den Dunnen, 1996). Células endoteliales promueven la formación de canales vasculares que son rodeados por prolongaciones citoplasmáticas de fibroblastos. Se proyectan neuritas provenientes del extremo proximal y migran SC (ectodérmicas) de ambos segmentos nerviosos (Spector y col., 1991; Strauch, 2000)(Figs. 26, bdf).

Crecimiento axonal –las neuritas alcanzan el extremo distal mediante movimientos ameboides y las SC envuelven a grupos de axones para iniciar el proceso de mielinización (Garbay, 2000) (Fig. 26,gh). Al final de este estadio, los nervios empiezan a agruparse en fascículos y aparecen separados por estructuras de colágena y fibroblastos perineurales que formarán el epineurio y perineurio primitivos. Durante este periodo las neuritas han alcanzado su órgano diana (músculo) y pueden distinguirse fibras nerviosas no mielinizadas, premielinizadas y mielinizadas (Figs.18,gh) (den Dunen, 1996; Garbay, 2000).

Mielinización – Finalmente la mielinización del nervio regenerado se evalúa por estudios clínicos y electrofisiológicos. En esta etapa la función nerviosa y sensitiva del nervio regenerado puede compararse con la función del nervio normal (Garbay, 2000).

7.2 FUNCIONES DE LAS CÉLULAS DE SCHWANN DURANTE LA REGENERACIÓN NERVIOSA

Las CS son consideradas las más importantes y esenciales en la regeneración nerviosa (Weinstein, 1999; Dezawa y col., 2000). Estudios *in vitro* e *in vivo* permitieron conocer sus funciones, pero se desconocen los mecanismos que emplean para migrar durante la regeneración nerviosa en asociación con las fibras nerviosas en crecimiento (Weinstein, 1999); entre sus funciones destacan:

1. Promover el crecimiento de neuronas y en general la regeneración neural (Dezawa, 2000).
2. Modulan y promueven el crecimiento neurítico al sintetizar factores neurotróficos (*NGF, BDNF, neurotropinas -3,4/5 (NT3, NT-4/5), CNTF, IGF1, IGF2, TGF- β , FGF1, FGF-2*), componentes de matriz extracelular (*fibronectina, laminina, tirosina-C, colágena tipo IV y VI*) y moléculas de adhesión celular (CAMs) (*molécula de adhesión celular-neural (N-CAM), lectina-1 (L1), glucoproteína asociada a mielina (MAG), Caderina-neural, integrinas*) (Weistein, 1999; Dezawa, 2000). Estas sustancias favorecieron la regeneración nerviosa al depositarlas en el interior de cámaras axónicas y entre las más estudiadas destacan el NGF (Spector y col., 1991ab, 1992, 1993), bFGF (Bates y col 1991), IGF-1 (Sjöberg y col., 1989), laminina, colágena tipo IV, moléculas de adhesión neural (Chen y col., 1995).
3. Son indispensables en la interacción CS-axón (*unidad regenerativa*) para que suceda regeneración nerviosa (Weinstein, 1999).

En la regeneración de nervios periféricos, es condición indispensable el contacto de las fibras nerviosas con las CS –“interacción CS/axón” (Weinstein, 1999; Dezawa, 2000), el complejo es modulado principalmente por factores neurotróficos (NGF y su receptor -RNGF) aunque se han detectado moléculas de adhesión celular avanzando junto con los conos de crecimiento y posiblemente coexiste una comunicación activa y bidireccional (vía retrógrada) hacia el soma neuronal (Fan y col., 1992; Weinstein, 1999). Los axones regenerados que se acompañan por nuevos complejos CS/axón, crecen del segmento nervioso proximal y se extienden hasta alcanzar el segmento distal (Dezawa, 2000).

7.3 IMPORTANCIA DE LA VAINA DE MIELINA

En el SNP, las CS forman la mielina por diferenciación de su membrana plasmática (Garbay y col., 2000), la función principal de la mielina es transmitir con mayor rapidez el impulso nervioso a lo largo del axón (Garbay y col., 2000). La velocidad del impulso se ve favorecida por sus propiedades: aislante, elevada resistencia eléctrica y baja capacitancia, lo que permite que la velocidad de conducción sea más rápida, se ahorre energía y espacio (Dumitru, 1994; Ganong, 1998; Garbay y col., 2000).

Por otra parte, la vaina de mielina es elemental para el correcto y eficiente funcionamiento del sistema nervioso; en el caso de las enfermedades desmielinizantes, éstas se caracterizan por invalidez debido al bloqueo de conducción de las fibras nerviosas lesionadas (Ganong, 1998; Garbay y col., 2000).

7.3.1 Composición de la vaina de mielina en el SNP

Bioquímicamente la mielina se distingue de las otras membranas biológicas, por su elevada proporción entre lípidos y proteínas, ella contiene 70-80% de lípidos y 20-30% de proteínas (Heape y col., 1989b). Su elevado contenido de lípidos le confiere la propiedad aislante, -requerida para la conducción saltatoria del impulso nervioso (Mugnaini, 1982; Garbay, 2000).

La mielina contiene todas las clases de lípidos (lípidos neutros, fosfoglicéridos y esfingolípidos), no hay evidencias de lípidos específicos, como sucede con las proteínas de mielina, sin embargo, se distinguen diferencias cuantitativas entre las especies (Garbay, 2000). Los ácidos grasos, componentes de los lípidos de mielina, se caracterizan por su elevado contenido en ácidos grasos saturados de cadena larga (20-24 átomos de carbono), la mayoría se encuentran presentes como esfingolípidos, en particular, el galactolípidos -C (Gal-C) (Bourre y col., 1993).

En la mielina del SNP, las proteínas representan entre el 20 y 30%, y a diferencia de los lípidos, existen diferencias en su composición y especificidad, el 60% lo representan las glucoproteínas (*PO*, *PMP22*, *MAG*, *Periaxina*, *Caderina-E*), el 20-30% está constituido por diversas proteínas (*CNP*, *PLP/DM20*, *Cx32*) (Garbay y col., 2000; Melgacani, 2000).

7.3.2 Mielinización del SNP

7.3.2.1 Factores que contribuyen en la mielinización

Se desconoce con precisión el señalamiento que precede a la mielinización, regulación y extensión de la formación de mielina, sin embargo; estudios *in vivo* e *in vitro*, han permitido identificar distintos factores indispensables para la mielinización (Garbay y col., 2000).

Entre los diferentes *señalamientos axónicos* que participan en la iniciación de la síntesis de mielina, destacan: -la interacción CS-axón, dependencia del diámetro axonal (> de 0.7 μm), tipo de axón (sensitivo o motor), participación neuronal en adición al contacto CS/axón (Garbay y col., 2000).

Otras sustancias involucradas en la mielinización han sido: -el TGF β 1 modula la interacción neurona/CS (Garbay y col., 2000), el adenosina-5-monofosfato cíclico (cAMP) involucrado como segundo mensajero en la promoción de mielinización (Melgacani, 2000) y durante los últimos años, se han demostrado los efectos neurotróficos de la PROG sintetizada por CS (Koenig, 1995, 2000), ésta hormona acelera el tiempo de iniciación de la formación de mielina y eleva su porcentaje de síntesis. Cuando las CS, reciben el señalamiento por parte de las fibras nerviosas para iniciar el proceso de mielinización, inmediatamente se modifica el programa de expresión genética y permite la síntesis de los constituyentes de mielina mediante los *factores de transcripción* -Oct-6, Krox-20 y Sox-10, que participan en el desarrollo del fenotipo de mielinización de las CS (Garbay y cols., 2000).

7.3.2.2 Síntesis de mielina

La organización morfológica del proceso de mielinización, fue descrita en el capítulo 2, sección 2.2 (Fig. 9 y 10) y en este apartado serán descritos algunos aspectos bioquímicos relacionados al “estadio inicial de mielinización” y al periodo “activo de mielinización”.

Previo a la mielinización, las CS mielinizantes expresan marcadores iniciales: el RNFG (Weintein, 1999), la proteína asociada al crecimiento 43 kDa (Garbay, 2000) y varias moléculas de adhesión celular, incluyendo la molécula de adhesión neural (N-CAM) y LI (Dezawa, 2000); al establecerse el contacto CS/axón, se producen los genes de PO, proteína básica de mielina (MBP), glucoproteína asociada a mielina (MAG) y galactosilcerebrósidos (Dezawa, 2000; Garbay, 2000), otros marcadores iniciales incluyen, los galactolípidos -Gal-C y SGal-C (Coetzee y col, 1998), su expresión es un factor importante en la progresión de la formación de mielina compacta. MAG y Gal-C son necesarias durante el estadio de

desarrollo axonal, la MAG establece la relación 1:1 entre SC y axón, y los Gal-C y SGal en la deposición de la primera lamela de mielina (Fig. 10) (Garbay, 2000).

El final del estadio promielínico y el inicio del “periodo de mielinización activo”, se caracterizan por la rapidez con la que CS sintetizan membranas que darán origen a numerosas vainas de mielina (Fig. 9); además, se acumulan los componentes específicos de mielina, -PO, PMP22, MBP, los componentes de membrana celular –glicerol-fosfolípido, fosfatidilcolina, cardiolipinas, colesterol y triglicéridos (Garbay, 2000). La acumulación temprana de proteínas y lípidos refleja la proliferación acelerada de CS (Dezawa, 2000), durante este periodo, los numerosos cambios bioquímicos que suceden en los nervios periféricos, son resultado del rápido incremento de las cantidades de componentes moleculares de la vaina de mielina (Garbay, 2000).

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

A pesar, de los refinamientos quirúrgicos y resultados favorables obtenidos con técnicas quirúrgicas convencionales (*neurorrafía y autoinjerto*) en la reparación de secciones traumáticas de nervios periféricos, han surgido complicaciones relacionadas con la alineación, coaptación fascicular y por lo tanto, retracción cicatrizal. Entre las más sobresalientes, se distinguen los neuromas, parestesias, limitación funcional, rigidez y la regeneración aberrante, que representan un elevado porcentaje de incapacidades, indemnizaciones y el más alto número de acciones medicolegales

Estas acciones han conducido que durante más de un siglo, persista el interés de desarrollar distintos modelos experimentales, para mejorar los resultados funcionales y reducir el traumatismo de los elementos nerviosos en la reparación de nervios seccionados. Así, se introdujeron las cámaras de tubulización de materiales endógenos y sintéticos, como sustituto de suturas y del injerto nervioso. Técnica que permite asistir la regeneración nerviosa mediante la aplicación “*in situ*” de diversos compuestos (precusores de matriz extracelular, factores neurotróficos, hormonas gonadales) al nervio lesionado, menor daño quirúrgico y mejor cicatrización que la resultante de suturas. Sin embargo, de distintos estudios con nervios axotomizados-tubulizados con cámaras de tubulización compuestas de materiales sintéticos (silicona), en los nervios ciático y facial de roedores, conejos, gatos, primates, ovejas y el nervio mediano del humano, se evidenciaron los siguientes aspectos: a) en lesiones con solución de continuidad de 3 a 10 mm, el porcentaje de regeneración fue menor del 75%, b) la presencia del material silicona a largo plazo, produjo compresión nerviosa, fibrosis neural y disfunción nerviosa; motivos que han conducido al desuso.

Con este panorama y con la innovación de resolver esos problemas, se introdujeron los biomateriales en la tubulización nerviosa. Hasta ahora, de los distintos biomateriales utilizados en la regeneración nerviosa, se han mostrado ventajas superiores con respecto a los resultados obtenidos de los materiales sintéticos. Los biomateriales, se biodegradan gradualmente, no requieren una segunda cirugía para retirarlos y actúan como vehículo de liberación de compuestos ó células. Esta biotecnología, permite la liberación constante y regular del compuesto en el sitio de acción, evita la aplicación repetida de sustancias y los efectos secundarios indeseables de una terapia sistémica. Con el uso de los polímeros sintéticos -PLA, PGA, polifosfazenos y el polímero natural alginato, se lograron excelentes resultados en lesiones con solución de continuidad hasta los 80 mm, en animales

mayores que los roedores, en el nervio ciático del gato y facial de conejos y ovejas, con resultados morfométricos y funcionales que no se lograron con materiales sintéticos.

Bajo este contexto y en consideración de los distintos factores que influyen sobre los resultados en la regeneración de nervios periféricos lesionados, se propuso utilizar en el presente trabajo el biomaterial quitosana como prótesis nerviosa en el nervio facial axotomizado de conejos. A diferencia de los polímeros sintéticos, la quitosana ofrece propiedades químicas y biológicas adicionales, no ha sido utilizada como cámara de tubulización y vehículo de liberación de compuestos en nervios periféricos seccionados. Además, la quitosana, ha mostrado resultados favorables en distintas aplicaciones biomédicas: como cicatrizante de úlceras cutáneas, quemaduras, estimulante inmune y como material de soporte para promover el crecimiento de células cerebrales normales y provenientes de gliosarcoma; ésta última, podría resultar benéfica para estimular la regeneración nerviosa.

Por otra parte, existe evidencia de los efectos neuroprotectivos, tróficos y mielinizantes de la PROG en neuronas y células gliales. En ratas, la administración *in situ* de PROG posterior a la axotomía, previene la muerte de motoneuronas faciales, incrementa la expresión de proteínas de mielina específica en oligodendrocitos y CS. En la corteza frontal, reduce los efectos que ocasionan las lesiones contusas (edema). En el nervio ciático de roedores y facial de hámsters, lesionados por congelación ó por aplastamiento, la aplicación *in situ* de hormonas gonadales, esteroides endógenos (PROG) y NFG, han beneficiado la regeneración nerviosa, al lograr la recuperación funcional y morfológica semejante al nervio normal.

En este trabajo, se planteó utilizar la PROG y otros neuroesteroides como la PREG ó DHA, contenidos en las paredes de las prótesis de quitosana, para que fueran liberados en el sitio del nervio lesionado en base de que no existen: 1) Estudios que muestren los efectos de éstos neuroesteroides en lesiones con solución de continuidad, 2) Se desconocen sus efectos moduladores, sobre la respuesta glial en el NMNF axotomizado y tubulizado, 3) No hay estudios del uso de la quitosana en nervios craneales seccionados y en especies mayores que los roedores; motivos principales del presente trabajo de investigación.

Con base a lo anterior, en el presente trabajo se evaluaron los efectos de los neuroesteroides PROG, PREG ó DHA en la regeneración del nervio facial del conejo y su respuesta glial en el NMNF axotomizado y tubulizado con una prótesis de quitosana conteniendo en sus paredes los mencionados neuroesteroides, para actuar como vehículo de liberación *in situ* en lesiones con

solución de continuidad de 10 mm de longitud. Los resultados del presente trabajo, ofrecerán una nueva estrategia en la reparación de secciones traumáticas de nervios periféricos.

HIPÓTESIS

La tubulización de la rama bucal superior del nervio facial de conejos, con una prótesis de quitosana conteniendo los neuroesteroides progesterona, pregnenolona ó dehidroepiandrosterona favorecen su regeneración y la modulación glial del NMNF, en lesiones con solución de continuidad de 10 mm de longitud.

OBJETIVO GENERAL

Evaluar los efectos de una prótesis de quitosana con cada uno de los neuroesteroides, progesterona, pregnenolona ó dehidroepiandrosterona, en dos estadios regenerativos de la rama bucal superior del nervio facial de conejos, en el que se provocó lesión con solución de continuidad de 10 mm de longitud, así como la respuesta moduladora de esta prótesis bioactiva sobre neuronas, astrocitos, oligodendrocitos y microglia del núcleo motor del nervio facial deaferentado.

OBJETIVOS PARTICULARES

1. Analizar la liberación de los neuroesteroides PROG, PREG ó DHA y su degradación, a partir de la pared de las prótesis de quitosana implantadas vía subcutánea, a los 15, 30 y 60 días, mediante cromatografía de gases y microscopía de luz.
2. Realizar un análisis cuantitativo ultraestructural de las estirpes celulares, el número de núcleos de células de Schwann (CS), de fibras no mielinizadas y su diámetro, en los segmentos proximal y distal del crecimiento nervioso, a los 15 días post-axotomía.
3. Determinar mediante microscopía de luz, el número de fibras mielinizadas y proporción “n”, en los segmentos proximal y distal y mediante análisis ultraestructural, -el número de núcleos de CS y de fibras mielinizadas y no mielinizadas, así como el área total de la fibra mielinizada, su diámetro y la proporción “g” a los 45 días post-axotomía.
4. Realizar un análisis morfométrico cuantitativo mediante microscopía de luz, el área nuclear, de Nissl y soma de neuronas del NMNF axotomizado a los 15 y 45 días poslesión y mediante ultraestructura el área nuclear de astrocitos, oligodendrocitos y microglia.

CAPITULO 8

METODOS GENERALES

8.1 ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN

Se utilizaron conejos machos adultos *Nueva Zelanda*, procedentes del bioterio del Centro de Investigación Biomédica de Occidente del IMSS. Las edades variaron entre 60 y 120 días, con peso de 2.5 a 3.0 kg respectivamente. Para el análisis de liberación “*in vivo*” de los neuroesteroides a partir de las prótesis de quitosana implantadas vía subcutánea, se destinaron 9 conejos, los cuales una vez gonadectomizados, fueron distribuidos aleatoriamente en 3 grupos ($n=3/\text{grupo}$), para cada uno de los neuroesteroides de estudio (PROG, PREG ó DHA). En los estudios de regeneración del nervio facial, se utilizaron 40 conejos gonadectomizados, que aleatoriamente fueron distribuidos en 4 grupos ($n=10/\text{grupo}$), para el estudio de los neuroesteroides, PROG, PREG ó DHA y el control VEH. Además, cada grupo se subdividió en dos grupos más, para los estudios de regeneración nerviosa, en los periodos de 15 y 45 días. Adicionalmente, se analizaron los nervios de 15 animales no operados (controles intactos). Durante el estudio los animales se mantuvieron a $22\pm 2^{\circ}\text{C}$ de temperatura, humedad relativa del ambiente entre el 50 y 55%, ciclos de luz-oscuridad de 12:12 horas, agua potable y alimentación con dieta balanceada “*ad libitum*”. Los animales fueron tratados siguiendo las recomendaciones de los Institutos Nacionales de Salud (NIH) de los Estados Unidos de Norteamérica para el manejo y utilización de animales de laboratorio para experimentación.

8.2 ELABORACIÓN DE PRÓTESIS DE QUITOSANA

Se utilizaron hojuelas de quitosana ($DP_w \cong 1500$ grado de acetilación $\cong 25\%$, obtenida de quitina de cangrejo, grado biomédico, Bioseed systems, CA), 3 g de éstas fueron depositadas en 300 ml de agua destilada y se dejaron en agitación durante 24 h a temperatura ambiente. Al día siguiente, se adicionaron 4.5 ml de ácido acético (Monterrey 0303) para disolverlas, se mezclaron y se dejaron durante 5 días en agitación a temperatura ambiente. Se obtuvo una quitosana soluble que fue filtrada al vacío (2 veces) y enseguida con filtros de medio de cultivo (Millex® -GS) de 3 μm y 0.22 μm , respectivamente. Más tarde, fue repartida en cuatro viales de 20 ml (Fig. 27). En distintos viales se agregaron 320 mg de PROG (Aldrich 85945-4), PREG (Sigma P-9129) ó DHA (Aldrich 12578-4), y en un vial no se

agregó ningún neuroesteroide (quitosana control vehículo). La cantidad de los neuroesteroides fue calculada tomando en cuenta que; al final del proceso cada prótesis de quitosana contuviera por lo menos 8 mg (Yu y col., 1989; Roof y col., 1996). Las prótesis fueron elaboradas manualmente utilizando un tubo de silicona como molde (Sani-Tech Medical grade, STHT-Co30) con 1.56 mm de diámetro externo y 0.72 mm de diámetro interno, de éste se usaron segmentos de 15 mm de longitud, insertos en agujas hipodérmicas (20G-30mm) para mantener permeable el lumen. Las prótesis fueron modeladas mediante inmersiones sucesivas del molde en la quitosana viscosa para formar las capas. La prótesis fue sumergida en una solución de NH_4OH (Baker 9721-60) al 10% (w/V) hasta que apareció un precipitado blanco, se lavaron exhaustivamente con agua destilada y cada 5 min se repitió el proceso, hasta completar la superposición de nueve capas. Se dejaron secar los tubos de quitosana durante 12 h a temperatura ambiente, se separó el tubo matriz de silicona y resultaron prótesis de quitosana con 1.7 mm de diámetro interno y 1.9 mm de diámetro externo (Fig. 27).

8.3 CROMATOGRAFIA DE GASES

La medición de las concentraciones de cada neuroesteroide en las prótesis de quitosana implantadas en el espacio sc en los diferentes tiempos, -15, 30 y 60 días, se realizó por cromatografía de gases (CG) en un equipo Chrompack Mod. CP 9000. Una vez que las prótesis se extirparon, éstas fueron trituradas en un mortero y posteriormente el extracto se cuantificó tres veces con 5 mL de diclorometano. Enseguida, el extracto combinado se colocó en un matraz volumétrico y se llevó a un volumen de 20 mL con diclorometano y posteriormente fueron analizados por CG. Las muestras fueron procesadas con una columna CPSII 5 CB 25 mX (0.32 mm x 0.12 μm) y como calibración estándar se utilizaron en forma externa los mismos neuroesteroides que contenían las prótesis. Las condiciones de cromatografía fueron: gas acarreador (Helio 80 mL/min), temperatura por inyector 270°C, temperatura del horno, isoterma de 220°C, volumen de inyección 1.0 μL , y detector: E.I.D. Los tiempos de retención de cada uno de los neuroesteroides son: PROG 19.96 min (estándar interno DHA), PREG 11.35 (estándar interno PROG) y DHA 14.96 min (estándar interno PREG).

8.4 PROCEDIMIENTOS QUIRURGICOS

8.4.1 Gonadectomía

Conejos machos adultos de 2 meses de edad y 1.8 - 2.5 kg fueron anestesiados por inyección intramuscular (im) de xylazina (Anased®) (2.5 mg/kg) y anestesia local en la zona púbica, mediante infiltración subcutánea (sc) con 0.5 ml de 2% de xilocaína. Se afeitó toda la región pubiana y mediante una incisión horizontal de 2 cm de longitud en la piel, se expuso la túnica albugínea, sobre esta se hizo un corte y mediante presión se extrajo por separado cada testículo, se ligó y cortó el paquete vasculo-nervioso que contenía el testículo con catgut 3-0; enseguida la piel fue cerrada con seda 4-0. Se dejaron pasar 30 días para que se abatieran los niveles séricos de hormonas, antes de utilizar los animales en los diferentes experimentos.

8.4.2 Implante subcutáneo de prótesis de quitosana

Los conejos fueron anestesiados por inyección intramuscular (im) de xylazina (Anased®) (2.5 mg/kg) y anestesia local mediante infiltración subcutánea (sc) con 0.5 ml de 2% de xilocaína en los espacios sc -del tercio medio del muslo, interescápulo-vertebral y carrillo derecho (siguiendo el trayecto de la rama bucal del nervio facial). Enseguida se afeitaron las zonas de implantación, y bajo condiciones estériles, se hizo una incisión de 1 cm de longitud en la piel, y en el espacio sc se formó un túnel donde se introdujeron las prótesis de quitosana de 10 mm de longitud (Fig. 27,f). En cada zona de implantación se introdujeron tres prótesis, por lo que cada animal recibió 9 prótesis. La herida fue suturada con puntos separados (seda 2-0). Al retirar las prótesis, dos de ellas se destinaron para análisis de cromatografía de gases y la tercera para estudio histológico.

8.4.3 Tubulización de la rama bucal del nervio facial

Para la axotomía-tubulización del nervio facial (Fig. 28,a), se utilizaron 40 conejos diferentes a los del estudio de cromatografía de gases. Estos fueron anestesiados con xylazina (Anased®) im (2.5 mg/kg), dehidrobenzoperidol im (1mg/kg) y 0.5 ml de 2% de xilocaína sc en el área de la rama bucal del nervio facial. Se afeitó y desinfectó todo el carrillo, el animal se colocó en decúbito lateral izquierdo y en condiciones estériles, con la ayuda de un microscopio quirúrgico, se expuso el nervio facial mediante una incisión horizontal (Fig. 28,a), separación roma de los planos tisulares, corte y ligadura de la glándula parótida. Enseguida se diseccionó la rama bucal superior del nervio facial y se seccionó

un segmento de 8 mm, al retraerse los muñones nerviosos resultó un defecto de 10 mm (Fig. 28,b). Inmediatamente se introdujeron los segmentos proximal y distal en la prótesis de 13 mm de longitud y se fijaron mediante dos puntos de sutura epineural, utilizando nylon 9-0 (Monosof N-2787) (Fig. 28,c), la herida quirúrgica se cerró por planos con catgut crómico 4-0 para tejido sc y nylon 6-0 para piel. El nervio control intacto correspondió a un segmento homólogo del nervio facial izquierdo de conejos VEH.

Al terminar la tubulización, los conejos fueron colocados sobre una manta tibia en una incubadora a temperatura ambiente hasta su recuperación y devueltos a sus condiciones habituales de bioterio.

8.5 PERFUSION INTRAVASCULAR PARA LA ELIMINACIÓN DE SANGRE Y FIJACIÓN DE LOS TEJIDOS

Los animales fueron sacrificados a los 15 y 45 días posesión, para el estudio cuantitativo con microscopía de luz y electrónica de transmisión de los crecimientos nerviosos y el NMNF lesionado. Mediante anestesia intraperitoneal (ip) con pentobarbital sódico (50 mg/kg), los conejos fueron perfundidos durante 15 min vía intracardíaca con 1000 ml de solución salina (Sigma S-5886) al 0.9% a 37°C, que contenía 1 g de procaína (Sigma P-9879) y 1,000 U de heparina (Sigma H-3393). Enseguida, durante 10 min se pasaron 800 ml de solución fijadora compuesta por 4% de paraformaldehído (Sigma P-6148) y 0.5% de glutaraldehído (Sigma G-7776), amortiguados en fosfatos 0.1M, pH 7.2. De los conejos perfundidos se retiraron las prótesis de quitosana con su contenido (Fig. 39 y 40), y mediante craneotomía, el cerebro y tallo cerebral (Fig. 33). Ambos tejidos, se fijaron adicionalmente por inmersión durante 48 h a temperatura ambiente y se lavaron en 3 cambios de 10 min en amortiguador de fosfatos.

Bajo control microscópico, se separaron las prótesis del crecimiento nervioso que contenían y se dividieron en tres fragmentos, -proximal, medio y distal. Enseguida, el tallo cerebral se separó del cerebro, se identificó el tercio superior y medio del 4° ventrículo, --zonas que contienen la totalidad del NMNF y el lado lesionado, respectivamente (Fig. 33). Posteriormente, con un vibratomo (Leica UT1000E) se obtuvieron cortes coronales de 100 µm de espesor y con un microscopio estereoscópico, de cada rebanada se extrajo el área correspondiente al NMNF axotomizado. Todos los tejidos fueron depositados en viales etiquetados, antes de procesarlos hasta su inclusión de resinas.

8.6 PROCESAMIENTO DE CRECIMIENTOS NERVIOSOS PARA ESTUDIO CON MICROSCOPIA DE LUZ Y ELECTRONICA DE TRANSMISION

Bajo el microscopio estereoscópico se disecaron los segmentos proximal y distal de los crecimientos nerviosos obtenidos de las prótesis de quitosana, se retiró todo el tejido circundante y los restos del fijador fueron eliminados mediante 2 cambios de 20 min en tampón fosfato 0.1M pH 7.3 (Sigma S-0751 y J.B.T. 3252-05), seguidos de 1 cambio de 15 min con cacodilato de sodio 0.1M pH 7.4 (Sigma C-0250), enseguida los tejidos se posfijaron en una solución al 1% de tetróxido de osmio (O_5O_4) (Sigma O-0631) disuelto en amortiguador de cacodilato de sodio 0.2M, pH 7.4 durante 90 min a temperatura ambiente. Al finalizar la posfijación los tejidos se lavaron en cacodilato de sodio 0.1M pH 7.4 (3 x 10 min) y se inició la deshidratación mediante cambios de 15 min en series crecientes de alcohol, a partir de 70%, 80% y 90% para terminar con dos cambios de 15 min en alcohol absoluto, la deshidratación fue completada con tres cambios de 15 min en óxido de propileno (Merck 12492).

A continuación se inició el proceso de inclusión de los tejidos en resinas, mediante una mezcla de resinas Poly/Bed® 812 (Polysciences Inc., Warrington, PA) y óxido de propileno en proporción 1:1, los fragmentos se dejaron toda la noche con agitación a temperatura ambiente. La mañana siguiente se retiró la mezcla y los tejidos se sumergieron en cápsulas Been (Sigma E-4265) que contenían resina pura, los fragmentos se orientaron respecto a la cara de corte y la resina con los tejidos se dejó polimerizar durante 48 h a temperatura ambiente.

Del material incluido, para exponer la zona de corte se formó una pirámide mediante tallado con una navaja de afeitar y posteriormente con cuchilla de vidrio (Sigma G-2403) los tejidos fueron cortados en un ultramicrotómo C. Reichert, Austria mod. OMU3, y se obtuvieron cortes de 0.5 μ m de espesor que fueron teñidos con azul de toluidina (Sigma T-0394). Mediante análisis con microscopía de luz determinamos el número de fibras mielinizadas y la proporción “n”, el procedimiento del análisis morfométrico está descrito en la sección 9.3.

Para obtener los cortes destinados al estudio con microscopía electrónica de transmisión (60-80 nm de espesor), se utilizó una cuchilla de diamante (Polysciences cat. 08452) en el mismo ultramicrotómo, las tiras de cortes fueron recogidas sobre rejillas de cobre de 150 cuadros (Sigma G1653) (Fig. 32), fueron contrastados durante 15 min con acetato de uranilo (Mallinckrodt 8632) y 5 min

con citrato de plomo (SPI 02616-AB) y examinados en un microscopio electrónico Zeiss EM906. El análisis morfométrico está descrito en la sección 9.3.

8.7 PROCESAMIENTO DEL NMNF PARA ESTUDIO CON MICROSCOPIA DE LUZ Y ELECTRÓNICA DE TRANSMISIÓN

Para la inclusión en resinas de los cortes de tejidos que contenían el NMNF, se siguió el mismo procedimiento descrito anteriormente (sección 9.6) para inclusión y corte. Solo que para éste propósito se utilizó la técnica de *“inclusión en plano”*, brevemente; una vez extraída el área del NMNF (Fig. 34,d), se incluyeron en resinas-óxido de propileno en proporción 1:1, la mañana siguiente se cambiaron a resina pura y se incluyeron en plano, para ello se utilizó un portaobjetos cubierto con parafilm® “M” (American National Can™, Greenwich, CT. 06836) y sobre el, se colocó una gota de resina y se depositó el tejido, con la ayuda de un microscopio estereoscópico nos aseguramos de la orientación correcta de las muestras, posteriormente sobre el tejido se invirtió una cápsula de gelatina previamente etiquetada y rellena de resina, ésta se dejó polimerizar durante 48 h a fin de obtener cortes. Los análisis morfométricos de la población neuronal y glial están descritos en la sección 9.4.

8.8 TINCION DEL TEJIDO NERVIOSO (NMNF Y CRECIMIENTO NERVIOSO) CON AZUL DE TOLUIDINA

Los colorantes básicos como el violeta de cresilo, la tionina y el azul de toluidina (Métodos de Nissl), permiten teñir la totalidad de las neuronas, células gliales y fibras nerviosas, aunque existen técnicas especiales para el análisis de su estructura. En el presente trabajo se utilizó el azul de toluidina como colorante para neuronas y fibras nerviosas. El procesamiento de los tejidos fue descrito en las secciones 8.6 y 8.7.

Las neuronas se distinguieron del resto de las células por su soma triangular, voluminoso de 20-50 μm , abundante citoplasma granular, presentan un núcleo esférico, traslúcido, éste último es voluminoso y provisto de un nucleolo grande que es fuertemente basófilo; además, en el citoplasma se identifican numerosos cuerpos de Nissl y ocasionalmente la insinuación de sus prolongaciones (recordar que los cuerpos basófilos de Nissl observados en microscopia de luz, corresponden al

retículo endoplásmico granular a nivel de microscopía electrónica) (DeFelipe y col., 1993; Peters y cols., 1994) (Fig. 29,a-e).

El estudio de las células gliales por microscopía de luz, no fue motivo de estudio, pero se reconocen métodos específicos que tiñen la neuroglia como *Weigert*, *Anglade*, *Alzheimer*, *Achucarro*, *metales pesados (oro)* y *Rio-Hortega*, entre los principales (DeFelipe y col., 1993). Sin embargo, la tinción con azul de toluidina identifica sus núcleos; no obstante, fue necesario considerar algunos aspectos morfológicos para distinguirlas de neuronas. Brevemente se describen algunas características morfológicas distintivas (Fig. 29,a-e); en general, las células neurogliales presentan escaso citoplasma y tienen un aparato de Golgi rudimentario; los *astrocitos* presentan núcleos grandes translúcidos de forma ovalada o redonda con cromatina dispersa (ésta característica no permite diferenciar los protoplasmáticos de fibrosos); los oligodendrocitos fueron identificados por sus núcleos redondos o ligeramente ovalados y un nucleoplasma con cromatina densa, y las células de microglia, -las más pequeñas, se caracterizaron por núcleos alargados fuertemente teñidos por la presencia de gránulos de cromatina (DeFelipe y col., 1993).

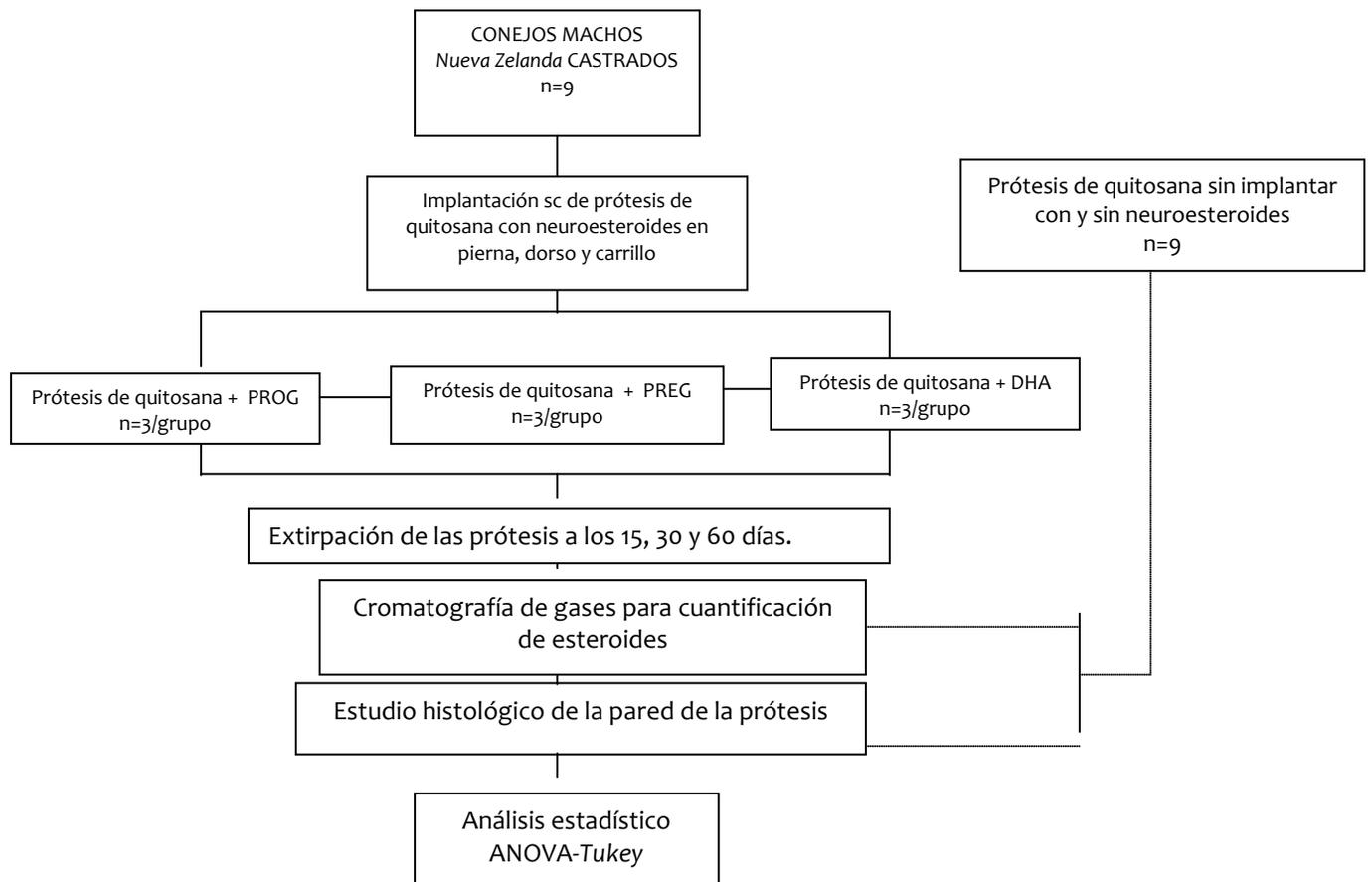
Para el análisis de los crecimientos nerviosos se hicieron cortes transversales, se identificó el nervio en regeneración por la presencia de conjuntos de fibras nerviosas, ellas mostraron un centro claro característico, rodeado por una vaina de mielina que apareció teñida con diferente intensidad (Fig. 30,fg).

CAPITULO 9

DISEÑOS EXPERIMENTALES

9.1 Análisis por cromatografía de gases de la liberación “in vivo”
de neuroesteroides desde la prótesis de quitosana

Estos experimentos tuvieron el propósito de analizar el comportamiento del biomaterial quitosana como vehículo de liberación de neuroesteroides, para ello se hicieron implantes subcutáneos (sc) de quitosana, con cada uno de los esteroides en sus paredes, para retirarse a diferentes tiempos.



Se analizó la liberación de los neuroesteroides PROG, PREG ó DHA, a partir de la pared de las prótesis de quitosana implantadas vía subcutánea, a los 15, 30 y 60 días, mediante cromatografía de gases.

Para estos experimentos, se utilizaron conejos machos adultos *Nueva Zelanda* con peso entre 2.5 a 3.0 kg, fueron repartidos aleatoriamente en 3 grupos de tres animales ($n=3$). Grupo uno= PROG, dos= PREG y tres=DHA. Todos los animales fueron anestesiados con xylazina im (2.5 mg/kg), y 0.5 ml de 2% de xilocaína sc y bajo condiciones estériles se implantaron aleatoriamente tres prótesis de quitosana de 10 mm de longitud, en cada espacio sc sobre el lado derecho del tercio medio del muslo, interescápulo-vertebral y el carrillo; las prótesis contenían un mismo neuroesteroide PROG, PREG ó DHA. Un total de 9 prótesis fueron implantadas en cada animal. A los 15, 30 y 60 días fueron retiradas las prótesis siguiendo el mismo orden descrito de implantación, y mediante cromatografía de gases se cuantificó la cantidad remanente de cada neuroesteroide. Durante estas determinaciones, como control intacto se utilizaron 9 prótesis homólogas a las retiradas, pero que no fueron implantadas, así se obtuvo la concentración inicial de las prótesis de quitosana con cada uno de los neuroesteroides.

En los experimentos de la sección 9.1 y 9.2, se eligió aleatoriamente el lado derecho como sitio quirúrgico, por el número de incisiones (6) pre y post-implantación realizadas en cada animal; según las recomendaciones del Instituto Nacional de Salud (NIH) de los Estados Unidos de Norteamérica para el manejo y utilización de animales de laboratorio para experimentación.

El análisis estadístico de éstos experimentos, se realizó mediante comparaciones de los valores promedio, a través de la prueba de análisis de varianza aleatorizada (ANOVA) de una sola vía y se utilizó la prueba de “Tukey” para las comparaciones *post-hoc* de los valores individuales de medias, a un nivel de significación de $p<0.05$.

9.2 Análisis histológico de la pared de las prótesis de quitosana implantadas en el espacio subcutáneo y manifestaciones clínicas

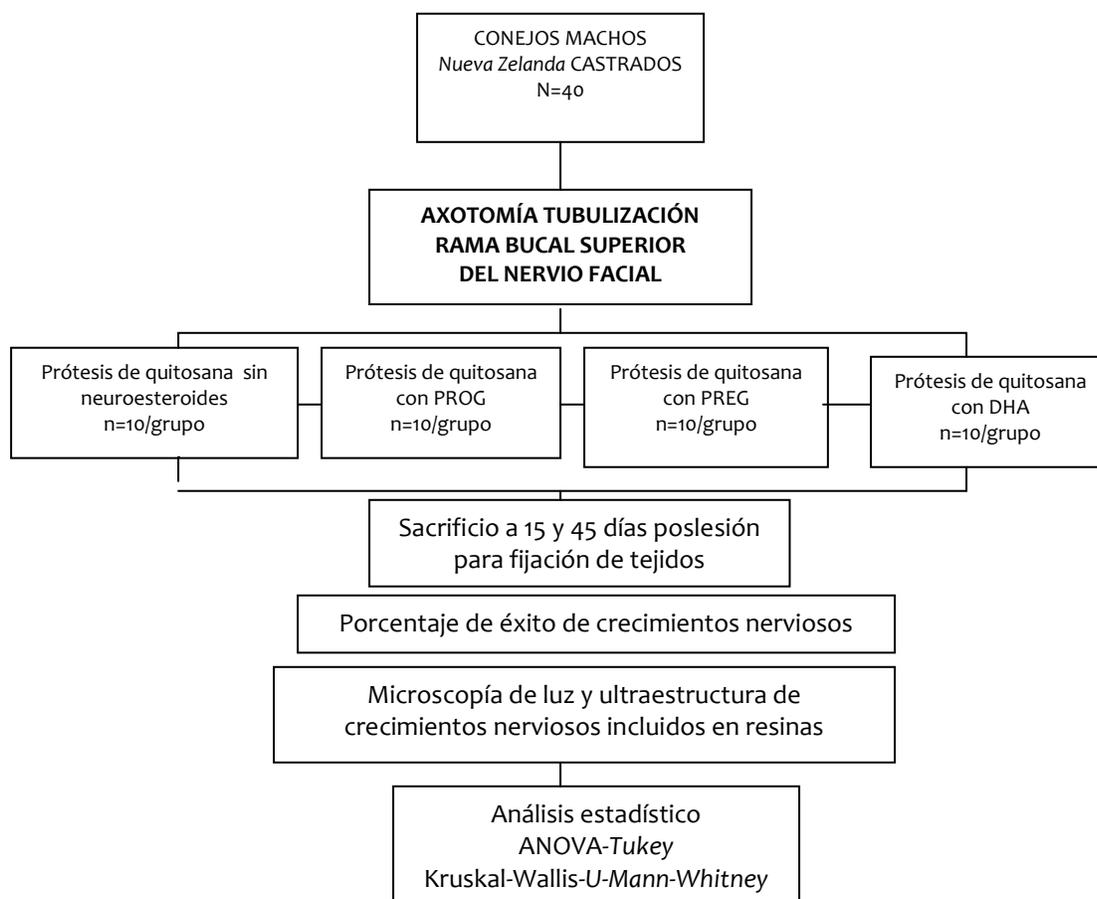
En cada periodo de implantación sc, en forma intencionada se exploraron en cada conejo, las manifestaciones locales clásicas de la respuesta inflamatoria por la presencia de la prótesis constituidas por los síntomas y signos de calor, rubor, tumor, dolor e impotencia funcional; además, puede añadirse la aparición de pus. Por otra parte, se analizaron las características físicas de las prótesis retiradas, -fracturas, colapsos o disrupción. Adicionalmente, mediante microscopía de luz se examinaron las paredes de las prótesis que contenían PROG, PREG ó DHA, a 15, 30 y 60 días post-implantación sc.

Para lo anterior fueron utilizados los mismos animales experimentales destinados a estudios de cromatografía de gases (sección 9.1), la tercera prótesis implantada en cada espacio sc del lado derecho de cada región; tercio medio del muslo, interescápulo-vertebral y el carrillo; se destinó al estudio microscópico. Estas fueron retiradas y analizadas en los mismos periodos, 15, 30 y 60 días.

Como control intacto, se utilizaron 9 prótesis de quitosana con y sin neuroesteroides que no fueron implantadas; éstas inmediatamente fueron procesadas hasta la inclusión en resinas epóxicas para analizar la morfología de su pared (sección 8.6). El estudio de todas las prótesis se realizó con cortes transversales de 1 μm de espesor, que fueron teñidos con azul de toluidina. Para el análisis cualitativo se registró, -la integridad de la pared y la presencia de tejido inflamatorio alrededor de la misma.

9.3 Análisis de la prótesis de quitosana y la influencia “in situ” de neuroesteroides sobre la regeneración del nervio facial en lesiones con solución de continuidad de 10 mm de longitud

Fueron analizados los efectos de la prótesis de quitosana como vehículo de liberación de PROG, PREG ó DHA sobre la regeneración del nervio facial en dos tiempos posesión.



A 15 y 45 días posterior a la axotomía y tubulización del nervio facial, se analizaron los crecimientos nerviosos obtenidos de las lesiones con solución de continuidad de 10mm de longitud. Del total de animales fue determinado el porcentaje de éxito regenerativo (prótesis en las que se produjo crecimiento nervioso) y de los nervios regenerados se obtuvieron las muestras para análisis morfométrico.

Se utilizaron 40 conejos machos adultos *Nueva Zelanda* de 2.5 a 3.0 kg, gonadectomizados 30 días antes de iniciar los experimentos, fueron divididos en cuatro grupos de 10 animales (n=10)/grupo y subdivididos en n=5/grupo para el periodo de 15 y 45 días. Grupo uno, VEH= recibieron prótesis SIN NEUROESTEROIDES, grupo dos= tubulizados con prótesis que contenían PROG, grupo tres= prótesis con PREG, grupo cuatro= prótesis con DHA.

A los 15 y 45 días poslesión, fueron perfundidos 5 animales de cada grupo (sección 8.5), se retiraron las prótesis de quitosana con su contenido y mediante disección fina se liberó todo el tejido conectivo circundante y se hicieron fotografías del contenido completo (Figs. 31 y 41). Fue determinado el *porcentaje de éxito* con base en el número de crecimientos nerviosos, respecto al número total de animales operados (axotomizados-tubulizados) (Spector y col., 1991; Dezawa, 2000). Mediante estudios de microscopía de luz y electrónica se analizaron los cables tisulares obtenidos de prótesis de quitosana en las dos etapas analizadas. Cuando se observó la presencia de tejido neuro-regenerativo, *-axones no mielinizados en contacto con CS y axones en diferentes estados de mielinización* (Spector y col., 1991; Dezawa, 2000); se consideró que el nervio se encontraba en proceso de regeneración.

Para establecer la morfología del nervio facial intacto (sin lesionar), se analizaron los nervios de 15 animales no operados (controles intactos) y de los nervios regenerados se analizaron los segmentos proximal y distal, de estas zonas se obtuvieron bloques de 1 mm de longitud que fueron procesados hasta su inclusión en resinas epóxicas (sección 8.5). Para el estudio de microscopía de luz, se realizaron cortes de 0.5 μm de espesor y para microscopía electrónica de transmisión (MET) de 60-80 nm de espesor (rango dorado).

Análisis por microscopía de luz:

De los crecimientos nerviosos obtenidos a los 15 y 45 días poslesión, se obtuvieron muestras a 2 mm del segmento nervioso proximal y a 2 mm del segmento distal (Campbell y col., 1992; de Dennen y col., 1996) (Fig. 31,a); se hicieron cortes de 0.5 μm de espesor y fueron teñidos con azul de toluidina. En los crecimientos nerviosos resultantes del periodo de 15 días, se estableció el área de corte para el estudio ultraestructural; de los obtenidos a 45 días, se determinó el número de *fibras mielinizadas* y la *proporción "n"*, resultante de la relación entre el área regenerativa y el área total del nervio, obtenida de un corte transversal (Spector y col., 1993; den Dunnen y col., 1996) (Fig. 31,b), -indicativa de madurez regenerativa. Para el análisis morfométrico cuantitativo de las fibras mielinizadas, se registraron 6 áreas de 2362 μm^2 , en un analizador de imágenes (Leica Q500IW).

Análisis ultraestructural:

Se obtuvieron muestras a 2 mm del segmento proximal y 2 mm del segmento distal, según lo reportado por Campbell y col., (1992) y de Dennen y col., (1996). El análisis ultraestructural se hizo

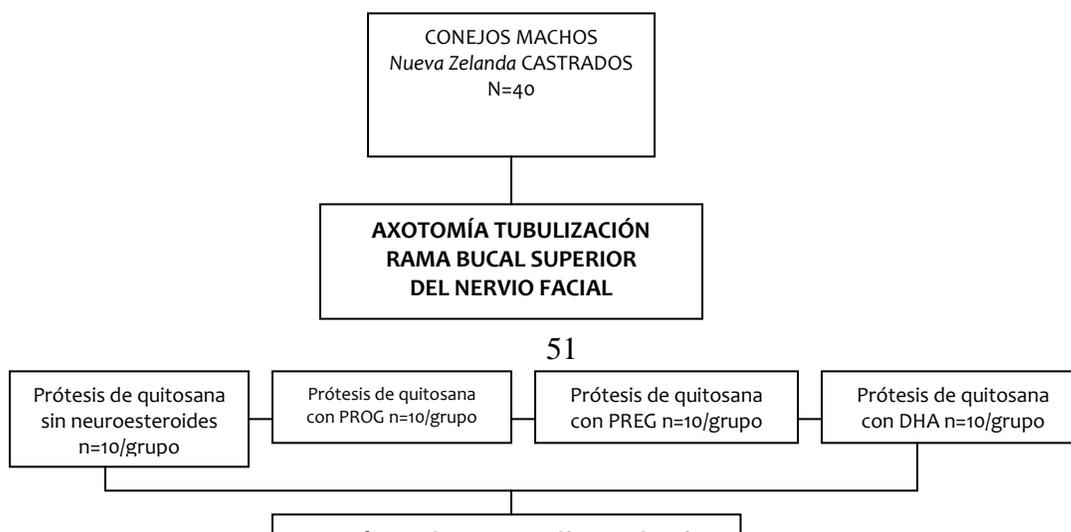
con un microscopio electrónico Zeiss EM906. Para el análisis de las estirpes celulares, número de núcleos de CS, número de fibras no mielinizadas y su diámetro, en crecimientos de animales sacrificados a los 15 y 45 días se registraron 5 áreas de $1850 \mu\text{m}^2$, a 1758X.

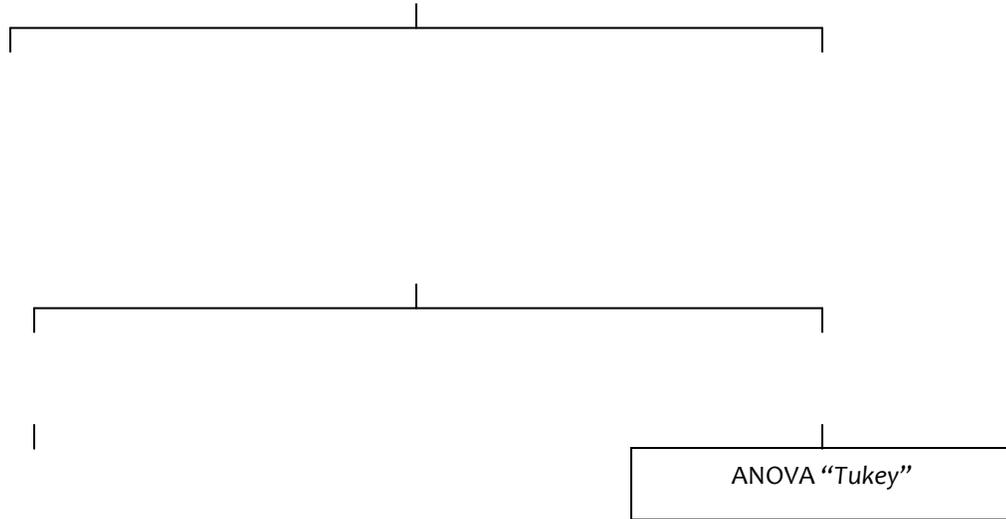
Adicionalmente, en los tejidos de conejos sacrificados a los 45 días se examinaron 5 áreas de $847 \mu\text{m}^2$ a 2758X, en ellos se analizaron las fibras mielinizadas (Fig. 32,ac); de las cuales se registró su número, área y diámetro. El grado de mielinización fue evaluado mediante el cálculo de la proporción “g” resultante de la relación entre el área del axón y de la fibra nerviosa (axón+mielina) (Spector y col., 1993; den Dunnen y col., 1996) (Fig. 32,a), -indicativa de madurez.

Para calcular los diámetros se utilizó la siguiente formula: $d=2(a/\pi)^{1/2}$, donde: (d=diámetro, a=área). La primera amplificación (1758X), con la que fueron examinados los tejidos de animales sacrificados en los primeros 15 días, permitió analizar una mayor área para cuantificar el número de núcleos de CS y fibras nerviosas. La segunda amplificación (2758X), usada en el análisis de crecimientos nerviosos sacrificados a 45 días, permitió cuantificar el área de mielina y el número de fibras mielinizadas. De las zonas analizadas se obtuvieron negativos en película de $8.3 \times 10.2 \text{ cm}$ (Kodak 4489), se hicieron impresiones en papel y de cada micrografía se analizaron todas las fibras mielinizadas con un analizador de imágenes (Leica Q500IW).

Para cada periodo, las variables fueron analizadas mediante la prueba de análisis de varianza aleatorizada (ANOVA) de una sola vía, y se usó la prueba “Tukey” para comparaciones *post-hoc* de los valores de medias entre grupos, se estableció un nivel de confianza de $p<0.05$ y $p<0.001$. El análisis de proporción “n” y “g” se hizo mediante la prueba estadística Kruskal-Wallis entre los diferentes grupos y U-Mann-Whitney para comparaciones *post-hoc* con significancia de $p<0.05$.

9.4 Respuesta neuronal y glial en el NMNF axotomizado y tubulizado con una prótesis de quitosana con neuroesteroides.





Con el objeto de analizar la posible influencia de los neuroesteroides liberados desde una prótesis de quitosana sobre la población neuronal y modulación glial en respuesta a axotomía-tubulización, en tejido nervioso de conejos sacrificados a los 15 y 45 días poslesión. Se estudiaron los tallos cerebrales de los animales experimentales destinados al análisis de crecimientos nerviosos a 15 y 45 días poslesión. Del tallo cerebral se localizó la totalidad del NMNF axotomizado y se obtuvieron rebanadas coronales de 100 μm de espesor, que fueron procesadas hasta su inclusión en resinas (sección 8.7), (Fig. 15 y 33).

Análisis morfométrico:

Para establecer la organización histológica normal, se analizaron los NMNF de 10 animales controles intactos, para estudiar la población neuronal se realizaron cortes de 0.5 μm de espesor teñidos con azul de toluidina, se analizaron mediante microscopía de luz y se registraron las neuronas de aspecto normal y con signos degenerativos; para el análisis morfométrico solo fueron analizadas las neuronas que tuvieran presentes núcleo, nucleolo y soma (Fig. 23,a); de ellas, se registró el área somática, área de Nissl y área del núcleo (μm^2) en un analizador de imágenes (Leica Q500IW). Los

resultados se expresaron como el incremento en el porcentaje de las áreas (somática, Nissl y nuclear) con respecto al control intacto.

Para el análisis de células gliales (astrocitos, oligodendrocitos y microglia) por MET, se obtuvieron cortes de 60-80 nm de espesor (rango dorado), de cada animal aleatoriamente se obtuvieron 10 micrograffas a una amplificación de 2758x (Fig. 21) que contenían 1-3 células gliales en promedio. Se imprimieron negativos en película de 8.3 x 10.2 cm (Kodak 4489), se hicieron impresiones en papel y de cada micrografía se analizaron todas las células, ellas fueron clasificadas por sus características morfológicas (Peters y col., 1991), se registró su área nuclear (μm^2) y con un analizador de imágenes (Leica Q500IW) se realizó el análisis cuantitativo.

Se realizaron comparaciones estadísticas mediante la prueba de análisis de varianza aleatorizada (ANOVA) de una sola vía y se utilizó la prueba “Tukey” para las comparaciones *post-hoc* de los valores de medias entre grupos a $p < 0.05$. El análisis de incremento porcentual se hizo mediante la prueba estadística *Kruskal-Wallis* entre los diferentes grupos y *U-Mann-Whitney* para comparaciones *post-hoc* con significancia de $p < 0.05$.

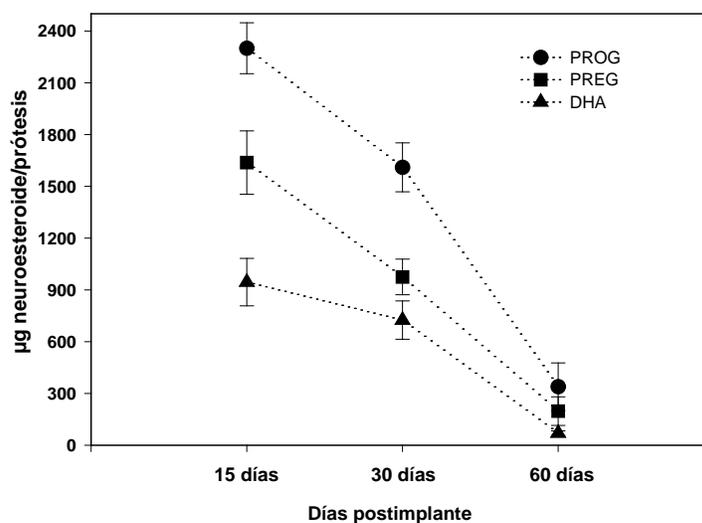
CAPITULO 10

ANÁLISIS HISTOLÓGICO DE LAS PRÓTESIS DE QUITOSANA IMPLANTADAS EN EL ESPACIO SUBCUTÁNEO Y LIBERACIÓN DE NEUROESTEROIDES

10.1 Cromatografía de gases

Un total de 27 prótesis de quitosana conteniendo en sus paredes los neuroesteroides PROG, PREG ó DHA, fueron implantadas vía subcutánea para el estudio de liberación de los mismos, la concentración final de 3 prótesis/neuroesteroide/animal fue analizada a los 15, 30 y 60 días mediante cromatografía de gases. Cada uno de los neuroesteroides estudiados mostró diferente velocidad de liberación, PREG ó DHA se liberaron más rápidamente que la PROG (Fig. 35), sin embargo; se redujo progresivamente la presencia de los tres compuestos respecto al tiempo.

Fig. 35 Liberación *in vivo* de neuroesteroides desde prótesis de quitosana.



Concentración inicial: 14,720 µg. Las barras expresan la media ± error estándar

La concentración inicial de neuroesteroides en cada prótesis fue de 14,720µg. Después de 15 días de implantación, el 75% del contenido inicial fue liberado. A los 30 días, el 85% de los neuroesteroides se habían liberado. Finalmente, a los 60 días post-implantación, un promedio de 200 µg de neuroesteroides se detectaron en las paredes de las prótesis.

Estos resultados demuestran que, la quitosana utilizada como prótesis nerviosa es un biopolímero apropiado para liberar compuestos, además; la liberación de estos compuestos puede modificarse al cambiar las propiedades de las paredes mediante la combinación con aldehídos (entrecruzamiento) y modular así, la liberación.

10.2 Estudios histológicos

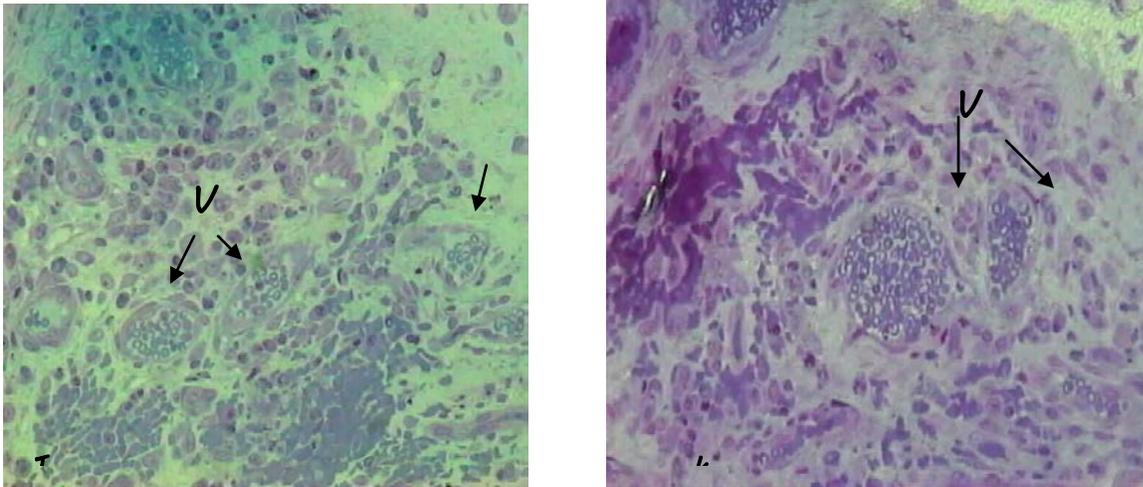
La respuesta tisular frente a la quitosana fue estudiada al implantar 9 prótesis que contenían el mismo neuroesteroide, en el tejido sc de cada conejo (n=3/grupo), la prótesis fue retirada a diferentes tiempos; -15, 30 y 60 días, desde las regiones receptoras del espacio sc del tercio medio del muslo, interescápulo-vertebral y carrillo derecho, respectivamente.

Durante el tiempo que permanecieron implantadas las prótesis no produjeron infecciones, ni fueron observadas complicaciones post-operatorias, en ninguno de los animales experimentales. Todas las prótesis se retiraron íntegras y se observaron cubiertas por una capa delgada de tejido conectivo.

Los cortes transversales de las prótesis no implantadas (Fig. 36), revelaron una pared compacta de 204 ± 29 µm de espesor y bordes (interno y externo) nítidos. Sin embargo, al estar en contacto con los fluidos intersticiales, se hincharon y mostraron una porosidad progresiva en sus paredes (*propiedad hidrofílica*), espacios que fueron ocupados por algunas células de origen inflamatorio. Durante los primeros 15 días post-implantación, la pared de las prótesis mostraron una matriz esponjosa que fue cubierta por moderado tejido inflamatorio (Fig. 37, adg). La pared fue significativamente más amplia (370 ± 28 µm) que en las prótesis no implantadas ($p < 0.001$) y los huecos median (61 ± 14 µm). Después de 30 días, la matriz reveló significativamente el máximo grosor (491 ± 26 µm) de todos los estadios de implantación ($p < 0.001$), también los huecos aumentaron (124 ± 15 µm); mismos que fueron infiltrados por escasas células inflamatorias (Fig. 37, beh). En este mismo estadio, fueron identificados en el centro de las prótesis algunos vasos sanguíneos (Fig. 30).

Finalmente, a los 60 días la matriz de las prótesis casi fue destruida ($155\pm 26\mu\text{m}$) pero significativamente más amplia, en comparación a las prótesis no implantadas ($p < 0.05$) y predominaron huecos grandes y vacíos ($138\pm 32\mu\text{m}$) (Fig. 37, cfi). Sin embargo, a pesar de las características histológicas de las paredes, al final de cada periodo de implantación, todas las prótesis cuando se examinaron en el estéreo microscopio, fueron más delgadas, transparentes y sin evidencia de fracturas o colapsos.

Las imágenes microscópicas de las prótesis de quitosana que estuvieron implantadas, sugieren que los neuroesteroides fueron gradualmente liberados según la resistencia de la pared al ataque de enzimas hidrolíticas (Fig. 37).



*Fig. 38 Vasos sanguíneos presentes en el interior de las prótesis de quitosana
(a) están rodeados por tejido*

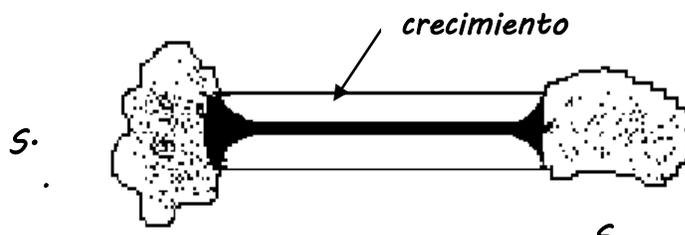
CAPITULO 11

ANÁLISIS DE CRECIMIENTOS NERVIOSOS
EN LAS PRÓTESIS DE QUITOSANA

11.1 Porcentaje de éxito

En los dos periodos analizados, fueron examinadas 40 prótesis de quitosana de 13 mm de longitud (cámara axónica de 10 mm), en ellas resultaron 35 crecimientos nerviosos, por lo que se obtuvo el 87% de crecimientos nerviosos (% de éxito) (Spector y col., 1991; Dezawa y col., 2000) (Fig. 39).

a *Crecimientos nerviosos en el interior de la prótesis*



b

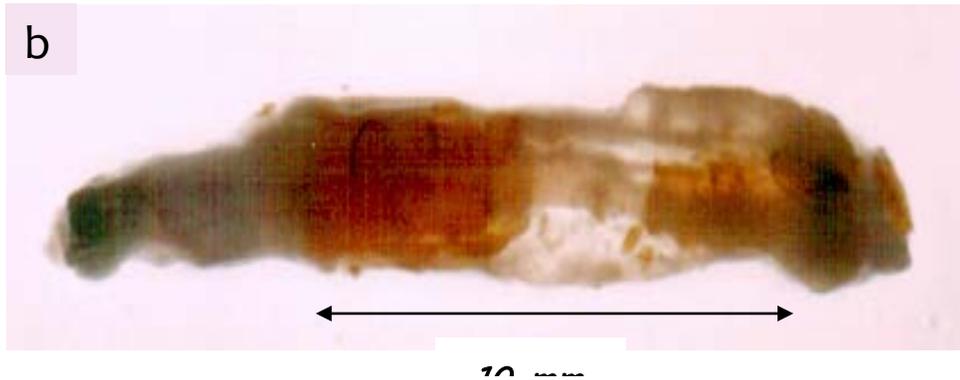


Fig. 39 *a*, esquema de un crecimiento nervioso dentro de la prótesis. *b*, crecimiento nervioso a 60 días poslesión obtenido de la rama bucal del nervio facial en conejos, se aprecia la prótesis que cubre el tercio

Entre los diferentes grupos de animales tubulizados se produjo un porcentaje de éxito mayor al 70% (Tabla VIII), sin diferencias estadísticas entre ellos (Fisher > 0.05). Sin embargo, solo el grupo de

animales tratados con PROG alcanzó en los dos periodos un porcentaje del 100%, mientras que, el grupo VEH reveló el porcentaje más bajo (70%).

Tabla VIII. Crecimientos nerviosos en prótesis de quitosana

Grupo/días	15	45	Porcentaje de éxito
VEH	4/5	3/5	7/10=70%
PROG	5/5	5/5	10/10=100%
PREG	5/5	4/5	9/10=90%
DHA	5/5	4/5	9/10=90%

Fisher >0.05

Por otra parte, se analizó la calidad de los crecimientos nerviosos, es decir; que el cable tisular que conecta los segmentos de proximal a distal, tuviera una dirección lineal, central y un calibre comparable al de un nervio normal. En la Fig. 40 se presentan algunos de los crecimientos nerviosos obtenidos a los 15 y 45 días posesión. En el primer periodo (Fig. 40,a), es evidente que los nervios tratados con PROG, revelaron un crecimiento lineal y calibre similar a un nervio normal (Fig. 40,c), en cambio; los crecimientos nerviosos de conejos VEH, PREG ó DHA manifestaron dehiscencia de los segmentos en el tercio medio, sin embargo; bajo microscopio estereoscópico fue posible observar continuidad del cable tisular.

A los 45 días (Fig. 40,b) los crecimientos nerviosos alcanzaron el calibre de un nervio normal, sin embargo solo los nervios tratados con PROG ó PREG lograron un crecimiento lineal regular, a diferencia del grupo tratado con VEH ó DHA, quienes revelaron irregularidades en el trayecto del cable nervioso, manifestadas por constricciones y rotación del tercio medio (Fig. 40, a-d).

Es importante considerar que la presencia del cable tisular y su calibre solo revela una parte del proceso regenerativo, sin relación con la calidad del mismo, es decir; pueden observarse calibres nerviosos semejantes a un nervio normal, sin que tengan una área regenerativa (presencia de fibras nerviosas).

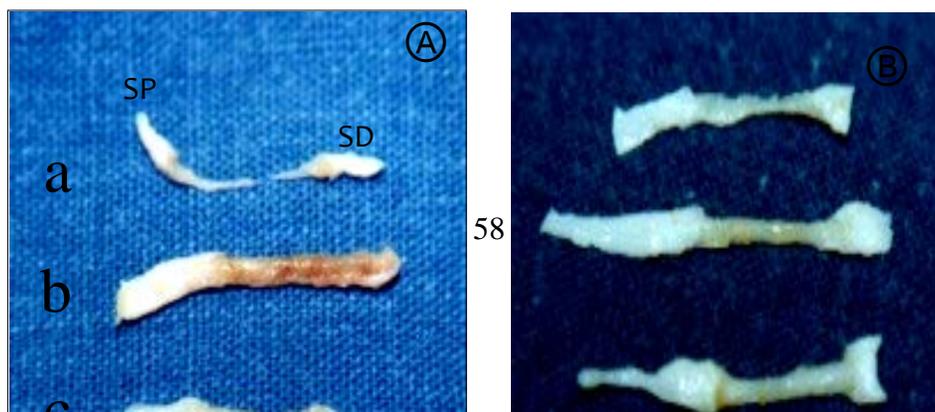


Fig. 32 Segmento nervioso proximal (SP) y segmento nervioso distal (SD) de crecimientos nerviosos de la rama bucal del nervio facial en lesiones con solución de continuidad de 10 mm de longitud, tubulizado con prótesis de quitosana con neuroesteroides. Ⓐ, 15 días, el cable tisular tratado con PROG (b) se distingue por su calibre lineal y uniforme, en cambio; los cables tisulares de los grupos VEH (a), PREG (c), DHA (d); muestran dehiscencia en su tercio medio, aunque preservan la continuidad del cable tisular. Ⓑ, Se muestran los cables tisulares obtenidos con los diferentes neuroesteroides a los 45 días poslesión. Los grupos tratados con VEH ó DHA presentaron constricciones y leve torcedura en sus cables tisulares. Ⓒ, Se muestra un segmento de la rama bucal del nervio facial en un conejo intacto (flecha), en comparación con el crecimiento nervioso tratado con PROG a 15 días poslesión (*), el cual tiene apariencia similar al nervio control intacto.

Los resultados obtenidos en este apartado, demuestran el estímulo favorable que ejerció el neuroesteroide PROG sobre la regeneración, manifestado por el mayor número de crecimientos nerviosos en los dos periodos estudiados y un calibre semejante al nervio control intacto.

11.2 Análisis ultraestructural del nervio en regeneración a los 15 días.

11.2.1 Células de origen mesodérmico

Mediante análisis ultraestructural de los segmentos nerviosos proximal y distal obtenidos a 15 días, fue evidente la presencia de elementos celulares correspondientes a los primeros cuatro estadios de regeneración; la *respuesta postraumática* en ambos segmentos nerviosos estuvo manifestada por la presencia de detritus de organelos citoplasmáticos y restos membranales (retículo endoplásmico) (Fig. 41, ab).

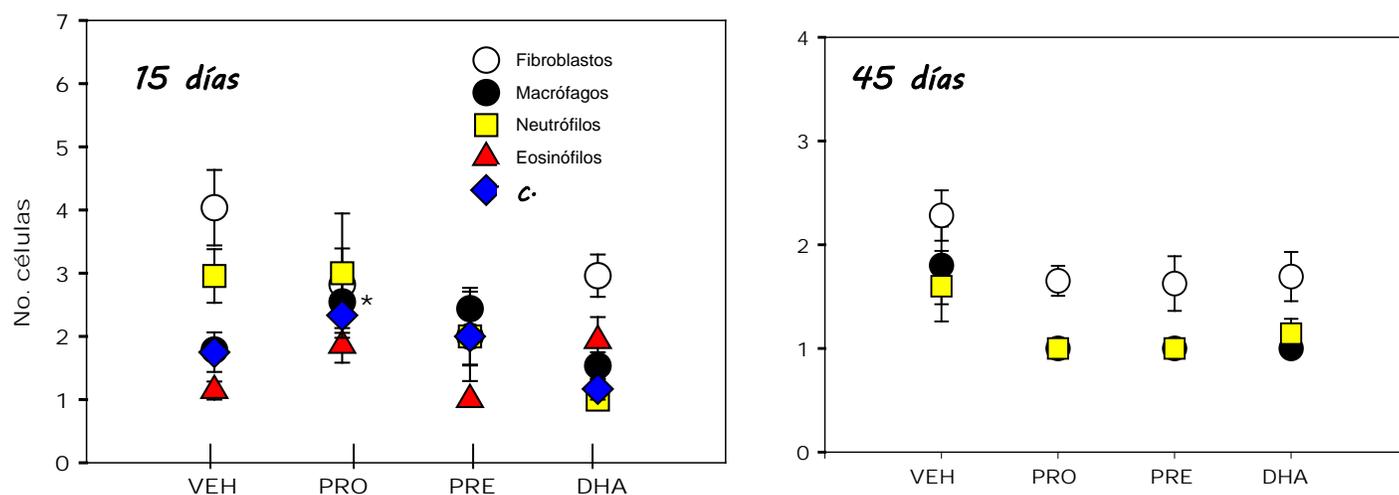
En ambos segmentos nerviosos de los grupos VEH y experimentales, se identificaron células de origen mesodérmico, -fibroblastos, macrófagos, neutrófilos, eosinófilos y células plasmáticas, todas ellas características del segundo estadio correspondiente a *migración celular y prolongaciones celulares* (Figs. 41-43), no hubo diferencias significativas entre los dos segmentos nerviosos, respecto al número de células ($p > 0.05$), a excepción del mayor número de macrófagos cuantificados en los nervios tratados con PROG ($p < 0.05$) (Fig. 46,a).

Los fibroblastos y sus prolongaciones formaban parte de un andamiaje trabecular, dispuesto longitudinalmente entre ambos segmentos, al parecer; directamente implicado en la orientación de las fibras nerviosas en crecimiento, migración y organización de las CS (Fig. 42), la actividad fibroblástica mostró dos patrones, -periférico y central, el primero estaba constituido por laminas concéntricas de sus prolongaciones citoplasmáticas y depósitos de colágena, -origen del epineurio primitivo (Fig. 44), en el segundo; las prolongaciones citoplasmáticas de fibroblastos rodeaban los grupos de fibras nerviosas junto con las CS, para formar los fascículos (Figs. 44, 47).

Los macrófagos y células inflamatorias, fueron las siguientes estirpes celulares más frecuentes, ambas se identificaron dispersas en la matriz de los segmentos proximal y distal (Figs. 41-43, 46), ellas están vinculadas con los procesos de fagocitosis y digestión de los detritus fagocitados, eventos que son apoyados por las imágenes de éste estudio que evidencian fagocitosis activa, pinocitosis y vacuolización intracitoplasmática (Figs. 42, 43).

Las células endoteliales vasculares se identificaron formando canales, rodeadas por las prolongaciones citoplasmáticas de los fibroblastos y separadas del tejido conectivo por una membrana basal (Fig. 45), la presencia de estos elementos caracterizaron el tercer estadio de *diferenciación de elementos vasculares*. La neo-vascularización fue notoria en la periferia y centro de todos los crecimientos nerviosos.

Fig. 46 Estirpes celulares de origen mesodérmico en crecimientos nerviosos.



Anova "Tukey" $p < 0.05$. *diferencia con respecto al VEH. La barra expresa la media

En todos los nervios de los distintos grupos estudiados, se distinguieron células plasmáticas, (Fig. 43) ellas son responsables del origen de las inmunoglobulinas, solo fueron identificadas durante el primer estadio de regeneración (15 días). Estas fueron más numerosas en el grupo de nervios tratados con PROG (Fig. 46), sin embargo; su presencia es motivo de otro estudio experimental, que comprende el análisis de la respuesta inmune en asociación con neuroesteroides y quitosana, ya que éstas células no han sido descritas en otros estudios experimentales semejantes.

La presencia de elementos celulares mesodérmicos en los dos segmentos nerviosos -proximal y distal, ha sido previamente descrita en el estadio inicial del proceso regenerativo que comprende las primeras 2 semanas poslesión. Por otra parte, en el análisis de células mesodérmicas a los 45 días poslesión, se observó una notable disminución (Fig. 46), ya no se observaron eosinófilos y células plasmáticas, resultado favorable en el proceso neuro-regenerativo.

11.2.2 Células de origen ectodérmico

11.2.2.1 Morfología general

En el análisis ultraestructural de los segmentos nerviosos proximal y distal, de nervios VEH y experimentales, además de células de origen mesodérmico, se observaron CS solas y envolviendo numerosas fibras no mielinizadas (Figs. 42, 47). Se identificaron fascículos en formación, localizados predominantemente en la región central del nervio, asociados con fibroblastos y sus proyecciones. En el interior de cada fascículo se distinguieron grupos de fibras no mielinizadas envueltos en forma incompleta o parcial por CS, todos estos hallazgos son eventos característicos del cuarto estadio, -*crecimiento axonal* (Fig. 48-51).

La organización estructural varió entre los diferentes tejidos analizados, en las muestras de conejos VEH, se distinguieron agrupamientos de fibras no mielinizadas irregularmente distribuidos, envueltos parcialmente por una CS, los agrupamientos se observaron aislados conteniendo un número reducido de fibras nerviosas y fibroblastos, predominando el material amorfo (Fig. 48).

En cambio, las muestras de animales tratados con PROG revelaron numerosos fascículos de mayor tamaño; unidos y delimitados por las prolongaciones citoplasmáticas de fibroblastos perineurales, en su interior contenían familias de CS, resultantes de división celular que envainaban numerosas fibras no mielinizadas (Fig. 49); en algunos fascículos se observó que las prolongaciones citoplasmáticas de las CS dividían grupos de fibras nerviosas. En otros crecimientos nerviosos de animales tratados con PROG, se distinguieron fibras no mielinizadas segregadas, otros pre-mielinizados y mielinizados (Fig. 53).

Por lo contrario, los tejidos de animales tratados con PREG ó DHA mostraron fascículos dispersos de diferentes tamaños con menor cantidad de fibras no mielinizadas envueltas por familias de CS cuyo citoplasma también dividía grupos de fibras nerviosas, sin embargo; fue evidente la presencia de una cantidad moderada de tejido amorfo entre los fascículos primitivos (Fig. 50,51).

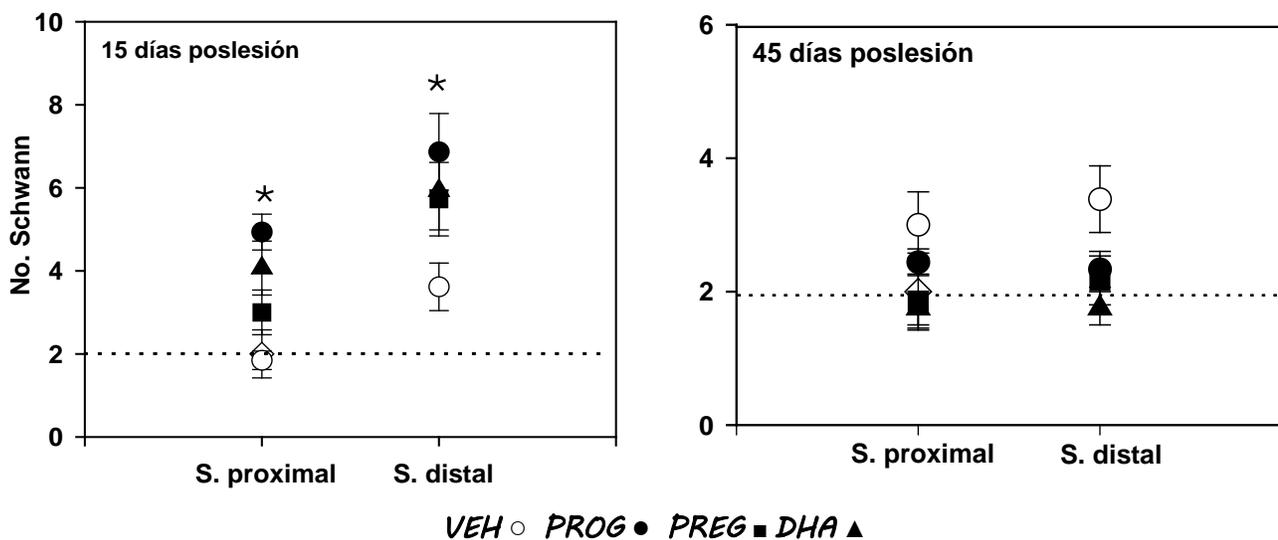
Desde los 15 días posesión, los hallazgos demostraron que estaba activo el proceso de regeneración nerviosa, ya que en ambos segmentos nerviosos se observaron fibras nerviosas y CS, sin embargo; fue notable la mejor organización nerviosa del segmento proximal (Fig. 48-51), al observarse un mayor número de fascículos, fibras nerviosas y CS -indicativos de una regeneración incipiente (Spector y col., 1991; 1993). A pesar que fueron observadas las fibras nerviosas en todas los crecimientos nerviosos, destacaron los efectos benéficos de la PROG.

11.2.2.3 Análisis del número de fibras no mielinizadas y células de Schwann

Núcleos de células de Schwann

La Fig. 54, muestra el número de núcleos de CS, presentes en los segmentos nerviosos proximal y distal de conejos sacrificados a los 15 y a los 45 días poslesión, en un área de $1850 \mu\text{m}^2$. En el primer estadio se identificó un mayor número de células en el segmento distal de todos los nervios examinados. A los 15 días el grupo PROG reveló el mayor número de CS por área analizada, en el segmento proximal estuvieron presentes 4.9 ± 0.4 células y 6.6 ± 0.9 en el distal (*media \pm error estándar*), mientras que; de los controles-VEH resultó un promedio de 1.8 ± 0.2 células, y de 3.6 ± 0.5 en los segmentos proximal y distal, respectivamente. A los 45 días se redujo la población de SC, éstas se encontraron homogéneamente repartidas en ambos segmentos. Los crecimientos nerviosos de animales tratados con PROG difirieron de los controles VEH (Fig. 54) en éstos los valores fueron más cercanos a la normalidad, 2 ± 0.5 CS por área analizada.

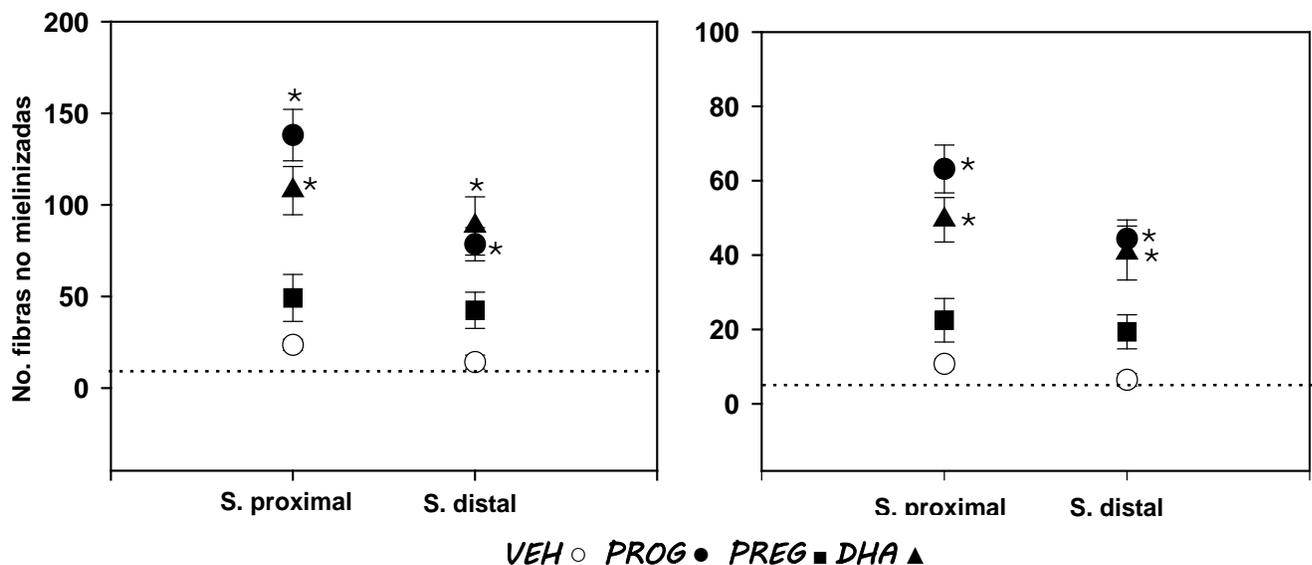
Fig. 54 Número de núcleos de células de Schwann.



ANOVA "Tukey" $p < 0.05$. *señalan las diferencias respecto a tejidos control VEH. La línea punteada indica los valores de nervios controles-intactos. Se

En los primeros 15 días poslesión, los crecimientos nerviosos de animales tratados con neuroesteroides se distinguieron por el mayor número de fibras no mielinizadas en un área de $1850 \mu\text{m}^2$, especialmente con PROG se obtuvo el mayor promedio (Fig. 55), en el segmento proximal fue de 138 ± 14 y 78 ± 9 en el distal, (*media \pm error estándar*) mientras que; en ausencia de neuroesteroides se registraron 23 ± 3 y 14 ± 3 fibras no mielinizadas en los segmentos proximal y distal, respectivamente.

Fig. 55 Número de fibras no mielinizadas del nervio en regeneración.



ANOVA "Tukey" $p < 0.001$ · *Indica las diferencias respecto a tejidos

En cambio, en el periodo de 45 días fue evidente la reducción del número de fibras no mielinizadas hasta un 45%, en los animales VEH y tratados con neuroesteroides. Sin embargo, en los nervios tratados con PROG ó DHA persistió el mayor promedio de número de fibras no mielinizadas, - con PROG resultaron 63 ± 6 en el segmento proximal y 44 ± 4 en el distal (*media \pm error estándar*); en cambio, en los tejidos de animales VEH resultó un promedio de 10.7 ± 1.3 fibras en el segmento proximal y 6.4 ± 1.7 en el distal (Fig. 55). Del nervio control intacto se registró un promedio de 7 ± 1.3 fibras no mielinizadas por área cuantificada. La Tabla II, muestra los valores del diámetro de axones no mielinizados, a los 15 y 45 días poslesión, en los segmentos nerviosos proximal y distal.

Tabla II. Efectos de una prótesis de quitosana con neuroesteroides sobre el diámetro de fibras en crecimientos nerviosos.

FIBRAS NO MIELINIZADAS						
		15 días		45 días		
		Proximal	Distal	Proximal	Distal	
INTACTO	0.89±0.02 µm					
VEH	0.74±0.08	0.53±0.11	1.56±0.06	1.22±0.03		
PROG	1.19±0.02*	1.03±0.03**	2.38±0.14*	1.65±0.04*		
ANOVA "Tukey" ** (p<0.05), * (p<0.001) indican						
	1.19±0.02	1.03±0.03	2.38±0.14	1.65±0.04		

De todos los tejidos analizados, en ambos periodos estudiados, los mayores diámetros de axones no mielinizados correspondieron al segmento proximal, a los 45 días alcanzaron un incremento del 90 y 100%. De los tres neuroesteroides utilizados, la PROG produjo los axones de mayor diámetro, 1.19 ± 0.02 µm a los 15 días y 2.38 ± 0.14 µm a los 45 días (*media ± error estándar*). Ambos valores correspondieron al segmento proximal y rebasaron el límite superior de confianza (IC 95%: 0.95-0.84). Por lo contrario, los diámetros de los axones no mielinizados de nervios controles VEH, rebasaron los límites de normalidad hasta los 45 días. El valor promedio, correspondiente al diámetro de axones no mielinizados de nervios controles intactos fue de 0.89 ± 0.02 µm.

En resumen; a través del análisis del estadio temprano y tardío con respecto al número de núcleos de CS, fibras no mielinizadas y diámetro axónico, los animales VEH mostraron los promedios mas bajos, -elementos indicativos de un retraso en la regeneración nerviosa. Sin embargo, es importante señalar que la presencia de fibras no mielinizadas en el crecimiento nervioso, no es

indicativa de anormalidad, debido a que; aproximadamente el 8% de las fibras no mielinizadas funcionan como fibras sensitivas y autónomas en un nervio intacto.

11.3 Análisis morfológico microscópico del nervio en regeneración, a los 45 días

11.3.1 Morfología general

Los cortes estudiados de animales VEH y experimentales, mostraron un patrón de neuro-regeneración típico, del centro a la periferia se distinguieron los diversos componentes nerviosos, fibras mielinizadas y no mielinizadas de diferentes tamaños, formas y diámetros, delimitados por fascículos pequeños y grandes, rodeados por elementos perineurales (fibroblastos). Cada fascículo contenía entre 3 y 40 fibras nerviosas (Fig. 57-58), así como una gran cantidad de vasos sanguíneos, sobre todo en la zona periférica del crecimiento nervioso.

En este estadio, los nervios provenientes de animales tratados con PROG, revelaron el mayor grado de madurez, se distinguieron los principales elementos nerviosos bien diferenciados por sus límites, los fascículos fueron de mayor tamaño. Las fibras se observaron de mayor diámetro y con incremento en el espesor de la vaina de mielina, pero sin alcanzar el diámetro y espesor de mielina de una fibra nerviosa normal, además; se observó escaso tejido conectivo entre las fibras.

Los cortes de nervios tratados con PREG ó DHA, también mostraron una regeneración organizada, menos desarrollada que la observada en los crecimientos nerviosos de los animales tratados con PROG pero con una mayor área regenerativa, que los nervios de animales VEH (Fig. 56) éstos se distinguieron por mostrar una escasa área regenerativa, abundante tejido conectivo entre las escasas fibras nerviosas y gran número de minifascículos, que contenían de 1 - 3 fibras, parcialmente mielinizadas.

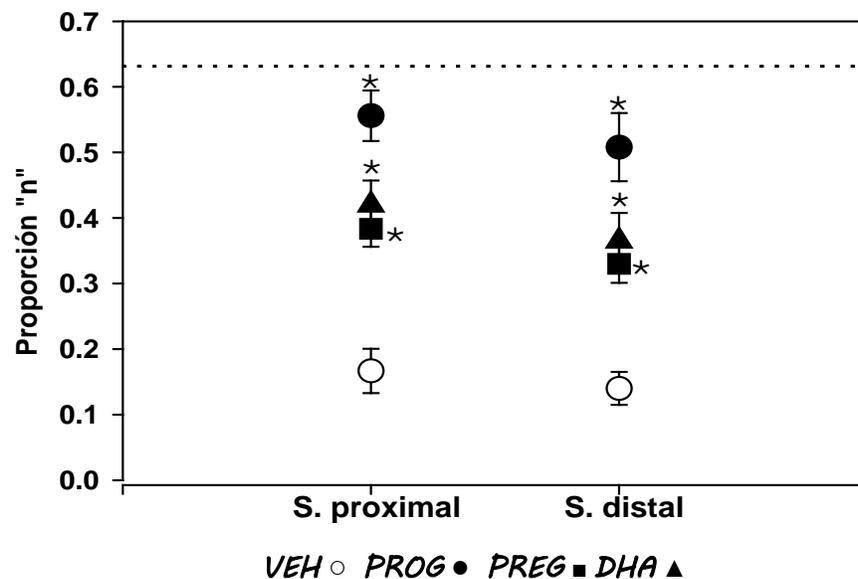
11.3.2 Proporción “n”

En cortes transversales de los nervios de animales VEH y experimentales, de los segmentos proximal y distal, se analizó la relación entre el área regenerativa y el área total del nervio,

=(proporción "n") – medida indicativa de madurez regenerativa (den Dunnen y col., 1996) (Fig. 60,61). La cuantificación de las áreas (μm^2) se realizó automáticamente, utilizando un analizador de imágenes.

Los valores promedio obtenidos del grupo de animales intactos y de los grupos de conejos VEH y experimentales se muestran en la Fig. 59. Los valores promedio de la proporción "n" de nervios controles intactos se obtuvo midiendo 15 nervios y resultó un rango de 0.45 a 0.86 y media de 0.64 ± 0.02 (media \pm error estándar), los límites de confianza al 95% fueron (IC 95%: 0.68-0.60).

Fig. 59 Efectos de neuroesteroides en la proporción "n" del nervio en regeneración.



IC 95%: 0.68-0.60

Kruskal-Wallis "U-Mann-Whitney" $p < 0.05$.

*Indica las diferencias significativas con respecto a VEH. Los valores señalan la media \pm error

De todos los grupos estudiados, los segmentos nerviosos proximal y distal de los conejos tratados con neuroesteroides mostraron la mayor proporción "n" con respecto al grupo VEH (Fig. 61), sin embargo; ninguno de ellos alcanzó los valores promedio del control intacto (0.64), ni los límites de confianza (IC 95%). Además; en los nervios analizados los mayores valores provenían del segmento proximal (Fig. 59).

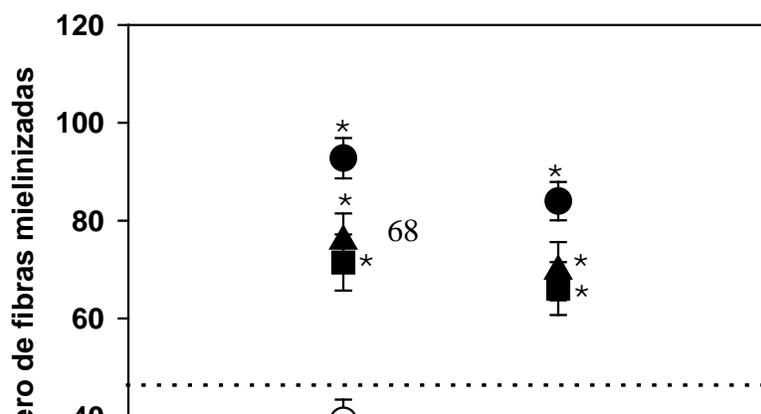
Los nervios tratados con PROG, mostraron la mayor proporción “n”, tuvieron un rango de 0.66-0.44 y una media en el segmento proximal de 0.55 ± 0.03 (*media \pm error estándar*) y en el distal de 0.50 ± 0.05 . En cambio; el grupo VEH reveló un rango entre 0.21-0.10 y los valores promedio fueron de 0.16 ± 0.03 y 0.14 ± 0.02 , en los segmentos proximal y distal respectivamente (Fig. 59).

11.3.3 Análisis cuantitativo de fibras mielinizadas

En cortes de 1 mm, de tejidos incluidos en resinas y teñidos con azul de toluidina, fueron cuantificadas las fibras mielinizadas presentes en el segmento proximal y distal de los nervios controles VEH y los experimentales, se analizó un área total de $14,172 \mu\text{m}^2$ ($6 \times 2,362 \mu\text{m}^2$). El valor promedio de fibras mielinizadas en la rama bucal superior del nervio facial de controles intactos fue de 47 ± 2.5 (*media \pm error estándar*) por área cuantificada, los rangos variaron de 36 a 100, y se establecieron los límites de confianza IC 95%: 52-42 (Fig. 62).

Del análisis de los segmentos nerviosos proximal y distal, resulta evidente que los mejores resultados esperados correspondieron a los nervios tratados con neuroesteroides, ellos sobrepasaron los valores promedio y los IC 95% de nervios controles intactos, utilizados como referencia. Los mejores efectos se observaron con los nervios tratados con PROG. Por otra parte; de todos los grupos analizados, el segmento proximal se distinguió por la presencia del mayor número de fibras mielinizadas, con respecto al segmento distal.

Fig. 62 Fibras mielinizadas de crecimientos nerviosos, regeneradas en prótesis de quitosana con neuroesteroides.



VEH ○ PROG ● PREG ■ DHA ▲

El tratamiento con PROG produjo un incremento del 83% de fibras mielinizadas, en comparación al nervio control intacto, en el segmento proximal los valores promedio correspondieron a 92 ± 4.1 fibras y en el distal, de 84 ± 3.9 por área cuantificada (*media \pm error estándar*). Para los nervios tratados con PREG resultó un incremento de 43% y de 59% en los tratados con DHA, mientras que; los valores promedio más reducidos correspondieron a los grupos de conejos controles VEH, ellos tuvieron un 25% menos de fibras mielinizadas que el nervio control intacto, el segmento proximal contenía 39 ± 4.3 y el distal 33 ± 3 respectivamente.

Los resultados indican efectos favorables de la PROG sobre la regeneración nerviosa, por su influencia se observó el mejor grado de organización estructural, -mayor número de fibras mielinizadas y mayor área regenerativa (proporción “n”).

11.4 Análisis morfométrico ultraestructural de los crecimientos nerviosos a los 45 días

11.4.1 Morfología general

A los 45 días, los segmentos nerviosos proximal y distal de los animales tratados con PROG mostraron un arreglo estructural parecido al de un nervio normal (Fig. 63), sin embargo; los nervios VEH, PREG y DHA no alcanzaron la organización del nervio intacto (Fig. 64-67). No obstante, los

hallazgos más destacados para ésta etapa fueron, -la organización fascicular de los tejidos, el mayor número de fibras mielinizadas distribuidas homogéneamente, provenientes del segmento proximal y la disminución en el número de fibras no mielinizadas y núcleos de CS.

Al comparar la organización estructural de los crecimientos nerviosos de conejos controles VEH y tratados con neuroesteroides, se observaron notables diferencias:

Los nervios VEH revelaron un retraso en la regeneración, evidenciado por la presencia de minifascículos, que en su mayor parte estaban ocupados por agrupamientos de fibras no mielinizadas, CS y un número reducido de pequeñas fibras mielinizadas, con una delgada vaina de mielina. Se observó material amorfo entre las fibras nerviosas, pero fue particularmente abundante alrededor de los fascículos (Fig. 64).

En cambio; los crecimientos nerviosos de conejos tratados con PROG, se caracterizaron por contener el mayor número de fibras mielinizadas distribuidas homogéneamente, con diámetros y vaina de mielina semejantes, escasas fibras no mielinizadas, CS y material amorfo, -elementos indicativos de madurez regenerativa (Fig. 65). Mientras que, los nervios tratados con PREG ó DHA mostraron fibras mielinizadas de diferentes tamaños, la mayoría fueron pequeñas, además se identificó un mayor número de fibras no mielinizadas, CS y moderado material amorfo (Fig. 66, 67).

La diferente morfología observada entre los distintos crecimientos nerviosos, de animales VEH y tratados con neuroesteroides, indica los efectos favorables de la PROG sobre la regeneración de nervios periféricos, fue evidente el mayor número de fibras nerviosas y el espesor de la vaina de mielina, semejante a la del nervio intacto.

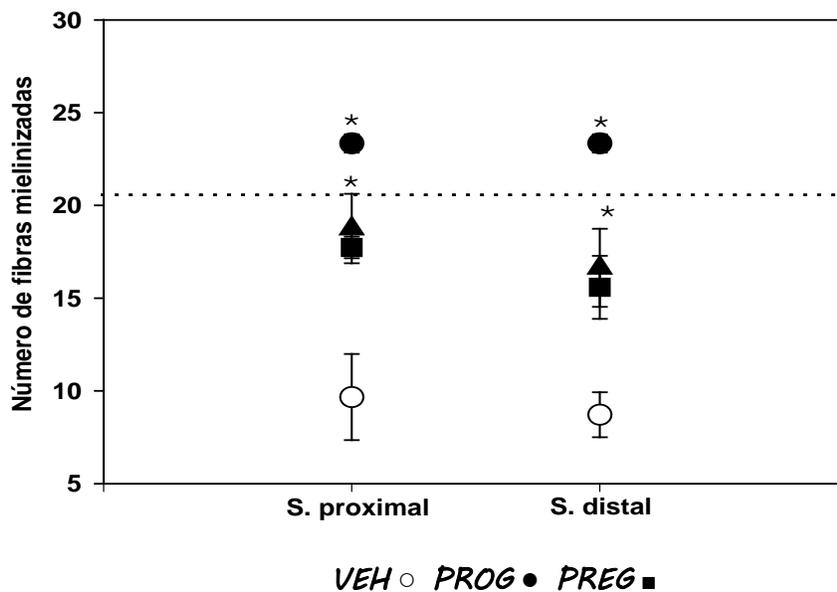
11.4.2 Análisis ultraestructural de fibras mielinizadas

Se siguió la metodología descrita en la sección 9.3 de materiales y métodos, fueron analizados los segmentos nerviosos proximal y distal de cada grupo de animales VEH y experimentales, de cada muestra se determinó, el promedio de fibras mielinizadas por área cuantificada, su diámetro (μm), área (μm^2) y proporción “g”.

a. Promedio de fibras mielinizadas

El valor promedio de fibras mielinizadas, en la rama bucal superior del nervio facial de conejos controles intactos, fue de 21 ± 1.4 (*media \pm error estándar*) por área cuantificada, los rangos fueron de 15 a 32 fibras, y los límites de confianza establecidos -IC 95% comprendieron de 24-18. La Fig. 68 muestra el promedio de fibras mielinizadas, de todos los grupos analizados. El segmento nervioso proximal mostró un escaso incremento del número de fibras mielinizadas, con respecto al distal.

Fig. 68 Análisis cuantitativo de fibras mielinizadas en crecimientos nerviosos a 45 días posesión.



1/05/2011

ANOVA "Tukey" $p < 0.001$. *Indica las diferencias significativas con respecto al VEH. Los valores

El grupo de animales tratados con PROG, reveló el mayor promedio de fibras mielinizadas, estuvieron dentro de los límites de confianza, tuvieron un rango entre 18 y 29 fibras, en el segmento proximal se registraron 23.3 ± 0.4 fibras y en el segmento distal 17.7 ± 0.5 (*media \pm error estándar*). En cambio, los nervios VEH presentaron un rango entre 4 y 12 fibras mielinizadas, la media fue de 9.6 ± 2.3 fibras en el segmento proximal y de 8.7 ± 1.2 en el distal. El nervio control intacto reveló un promedio de 21.2 ± 1.4 fibras mielinizadas, por área analizada.

b. Diámetro de las fibras mielinizadas

Los mayores valores correspondieron a los tejidos de animales implantados con prótesis que contenían PROG, seguidos de las que tenían DHA y los menores valores se encontraron en los crecimientos de animales VEH (Tabla III). En animales intactos, los valores promedio en el diámetro de fibras mielinizadas fueron de $5.89 \pm 0.10 \mu\text{m}$ (*media \pm error estándar*), los rangos entre 2.69 a 14.2, y los límites de confianza establecidos fueron -IC 95%: 6.04-5.68.

Tabla III. Diámetro de fibras mielinizadas

Diámetro (μm)		
Grupo	Proximal	Distal
INTACTO	5.89 \pm 0.10	
VEH	3.49 \pm 0.19	3.38 \pm 0.14
PROG	4.75 \pm 0.08*	4.51 \pm 0.09*
PREG	4.08 \pm 0.1	3.92 \pm 0.14
DHA	4.33 \pm 0.08*	4.55 \pm 0.08*

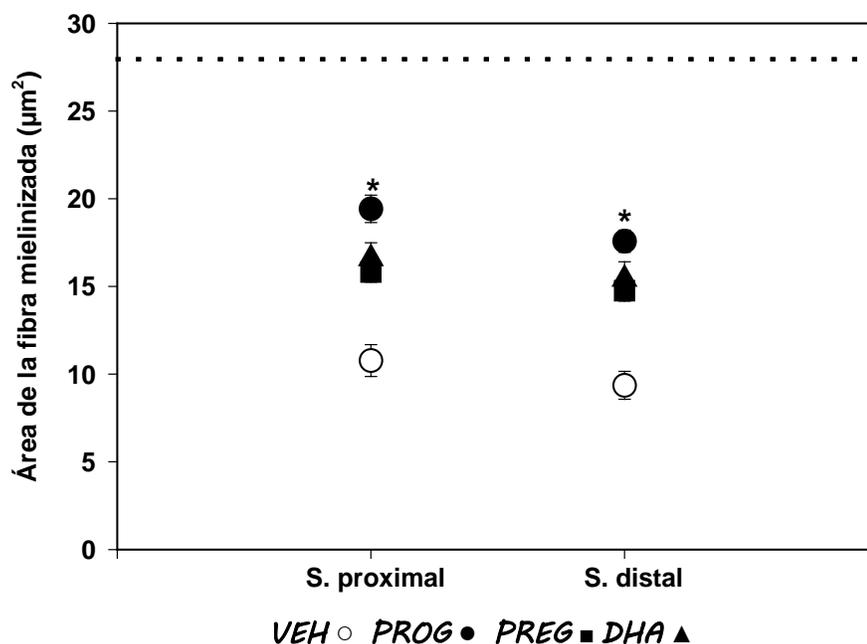
*ANOVA "Tukey" $p < 0.05$. *Indica las diferencias significativas respecto a VEH.*

Ninguno de los diámetros de las fibras mielinizadas en los crecimientos nerviosos estudiados, (VEH ó neuroesteroides) alcanzaron los límites de confianza (IC 95%: 6.04-5.68), sin embargo; los mayores diámetros resultaron por la influencia de PROG, éstas fibras presentaron rangos entre 1.7 a 12.4, en cambio; los diámetros de las fibras mielinizadas de animales VEH, tuvieron los valores promedio más bajos y rangos entre 1.0 a 8.6.

c. Área de la fibra mielinizada

La Fig. 69, muestra el área de las fibras mielinizadas en los segmentos nerviosos proximal y distal, obtenidos de la rama bucal superior del nervio facial de conejos VEH y experimentales, que fueron axotomizados y tubulizados con prótesis de quitosana y neuroesteroides.

Fig. 69 Área de la fibra mielinizada (μm^2).



IC95%: 30.6-26.6

*ANOVA "Tukey" $p < 0.05$, *Indica las diferencias respecto al VEH. La línea punteada expresa los*

Todos los nervios reparados con prótesis que contenían neuroesteroides, particularmente PROG, revelaron valores superiores con respecto a los de nervios VEH, sin embargo; en ningún caso se alcanzaron los límites de confianza (IC 95% 30.6-26.6). En ambos segmentos analizados, la mayor área de la fibra mielinizada se encontró en los crecimientos nerviosos del grupo de conejos tratados con PROG ($19.4 \pm 12.4 \mu\text{m}^2$). A pesar de no haber logrado alcanzar los niveles del nervio control intacto, se consideran estos valores indicativos de éxito regenerativo, estimando que en esta etapa el proceso regenerativo todavía se encuentra activo.

d. Proporción “g”

En este estudio, también fue calculada la proporción “g” (área del axón/área de la fibra nerviosa), -medida indicativa de madurez, refleja el grado de mielinización, con respecto al axón. A menor proporción “g”, mayor superficie ocupada por mielina. En general; entre los distintos tejidos analizados se registró un rango de valores entre 0.45 a 0.70, equivalentes al 55% y 30% de superficie ocupada por mielina (Tabla IV).

Tabla IV. Mielinización en el nervio facial a los 45 días

	Proporción “g”	
	Proximal	Distal
INTACTO	0.32±0.001	
VEH	0.59±0.02	0.70±0.02
PROG	0.45±0.01*	0.48±0.01*
PREG	0.56±0.01	0.60±0.01
DHA	0.52±0.01	0.59±0.02

*Kruskal-Wallis “U-Mann-Whitney”
p<0.001. *Indica las diferencias
significativas con respecto a VEH. Los*

A pesar que, en ningún caso se alcanzaron los límites de confianza (IC 95%:0.34-0.30), las principales diferencias para el segmento proximal y distal se manifestaron en el grupo PROG, con una proporción “g” de 0.45 para el segmento proximal y 0.48 para el distal, en tanto, el grupo VEH presentó proporciones de 0.56 y 0.70, respectivamente. En todos los grupos la mielinización fue mayor en el segmento proximal. La proporción “g” en los nervios controles intactos fue de 0.32, correspondiente a un 68% de superficie ocupada por mielina.

CAPITULO 12

ESTUDIOS DEL NÚCLEO MOTOR DEL NERVI FACIAL LESIONADO POR AXOTOMÍA

12.1 *Análisis morfométrico mediante microscopía de luz de la población neuronal*

Fueron analizados 40 tallos cerebrales que incluían la totalidad del NMNF en conejos machos castrados, sometidos a axotomía-tubulización de la rama bucal superior del nervio facial, las etapas examinadas fueron 15 y 45 días, en un grupo VEH (*quitosana sin neuroesteroides*) y tres experimentales (*quitosana con PROG, PREG ó DHA*). En forma paralela se analizaron 12 tallos cerebrales de conejos machos no lesionados y no castrados (*controles intactos*).

Todos los NMNF (Fig. 33), se incluyeron en resinas y fueron teñidos con azul de toluidina, de ellos, se obtuvieron cortes coronales de 0.5 μm de espesor y de cada muestra se examinó el número de neuronas, la integridad estructural neuronal y se distinguió claramente el núcleo, nucleolo y los límites del citoplasma (Fig. 34 y 70).

Morfología general

Con el propósito de conocer los cambios morfológicos típicos en el cuerpo celular neuronal posterior a la axotomía (*inflamación celular, migración del núcleo hacia una posición excéntrica y la aparente desaparición del material basofílico -“sustancia Nissl”- del citoplasma*), y los efectos moduladores de los neuroesteroides, se registraron cuantitativamente los cambios en el área nuclear, área de Nissl y área somática (Fig. 34).

A los 15 días poslesión, todos los grupos estudiados VEH y experimentales, revelaron cambios morfológicos significantes, *-el núcleo esférico adquirió una forma alargada y excéntrica, además, fueron observados cambios en el nucleoplasma, -heterogéneo por la presencia de numerosos gránulos de cromatina (Fig. 71, a-d)*. En cambio, a los 45 días poslesión, el núcleo se transformó nuevamente hacia la forma esférica (Fig. 72, a-d) y el nucleoplasma reveló una apariencia homogénea, *-se redujeron los gránulos de heterocromatina y permanecieron como grumos a lo largo de la cisterna perinuclear; los cambios en el núcleo y nucleoplasma, reflejan la actividad metabólica, sin embargo, mediante microscopía de luz, no fue posible observar otros signos característicos del incremento en*

el metabolismo del aparato nucleolar (*hipertrofia nucleolar, pérdida del nucleolonema, vacuolización o crecimiento de las áreas vacuolares y cambios en el número de centros fibrilares*) (Jones y col., 1996).

Por otra parte, desde el período temprano fue evidente el aumento de volumen *del soma* neuronal. Los cambios morfológicos representativos se observan en las Figs. 71 y 72. En general; durante el periodo temprano el soma neuronal apareció alargado, edematizado y cambió hacia la redondez en el periodo de 45 días, durante esta etapa persistió edematizado en todos los grupos de neuronas de tejidos controles VEH y experimentales; -el aumento del volumen del soma neuronal, resulta de la dilución del contenido celular y está asociado con el estadio temprano de la respuesta a la axotomía, mientras que; el incremento de estructuras nucleares y organelos se observa durante los estadios tardíos de la axotomía, ellos actúan como reservorio de los materiales sintetizados para regenerar al axón.

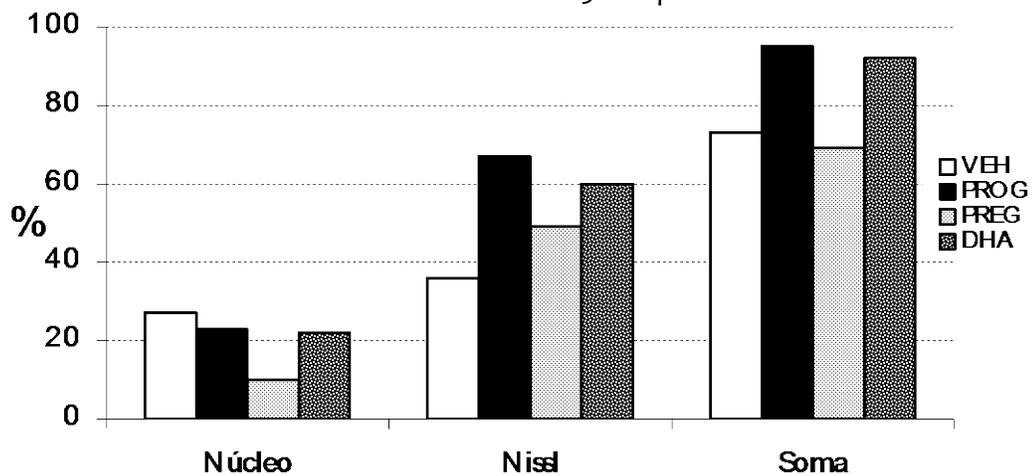
La “*Sustancia de Nissl*”, reveló diferentes grados de dispersión en el citoplasma de las neuronas de animales VEH y experimentales, en algunos de ellos, la dispersión fue más evidente sin causar diferencias significativas entre los grupos (Fig. 71 y 72). A los 15 días, en todas las muestras VEH y experimentales, se distinguió un citoplasma translúcido, la sustancia de Nissl parecía fragmentada y marginada en la periferia del cuerpo celular (cromatolisis), patrón difícil para su identificación y cuantificación; sin embargo, a los 45 días, fue fácilmente distinguible, ésta se identifica más compacta y organizada alrededor del núcleo (Fig. 72,a-d). Las modificaciones morfológicas que presenta la sustancia de Nissl, reflejan los cambios en el metabolismo del RNA y son la base histológica que describe el fenómeno de cromatolisis (Jones, 1996,1997,1999).

Los resultados del análisis cualitativo del núcleo, soma y sustancia de Nissl, solo reflejan la respuesta tisular frente a la axotomía, es decir; los cambios morfológicos están relacionados con la reparación del daño y representan una alteración del estado funcional, especialmente los que conducen a la regeneración del axón. Sin embargo, no fueron indentificadas diferencias morfológicas significantes por la administración de los neuroesteroides, con respecto a los animales VEH.

Los cortes transversales del NMNF de los conejos axotomizados-tubulizados, contenían unilateralmente en promedio 90 neuronas/conejo; sin embargo, no hubo diferencias significantes en el número de neuronas entre los animales VEH, experimentales y el control intacto, respectivamente. Para registrar cuantitativamente las alteraciones morfológicas de la población neuronal en respuesta a la axotomía, se examinaron en promedio 60 neuronas de cada grupo (VEH, PROG, PREG, ó DHA) y periodo (15 y 45 días); las áreas subcelulares fueron: -núcleo, soma y sustancia de Nissl.

En las dos etapas evaluadas, se evidenció un incremento significativo de la extensión en todas las áreas señaladas ($p < 0.001$) al comparar los valores obtenidos de los animales VEH y experimentales con los tejidos controles intactos (Fig. 73-74). En la etapa temprana no hubo diferencias significativas entre el grupo VEH y los conejos tratados con neuroesteroides ($p > 0.05$); sin embargo, a los 45 días posesión, en las muestras de animales tratados con PREG se observó disminución en la extensión de las estructuras estudiadas, resultando diferencias significativas con respecto a los valores de tejidos control-VEH ($p < 0.05$) (Fig. 74).

Fig. 73 Incremento porcentual del área nuclear, de Nissl y soma neuronal a 15 días posesión.



Kruskal-Wallis-U Mann Whitney $p < 0.001$ (vs

Análisis cuantitativo del área nuclear, sustancia de Nissl y somática, de neuronas del NMNF lesionado por axotomía-tubulización.

a. 15 días posesión

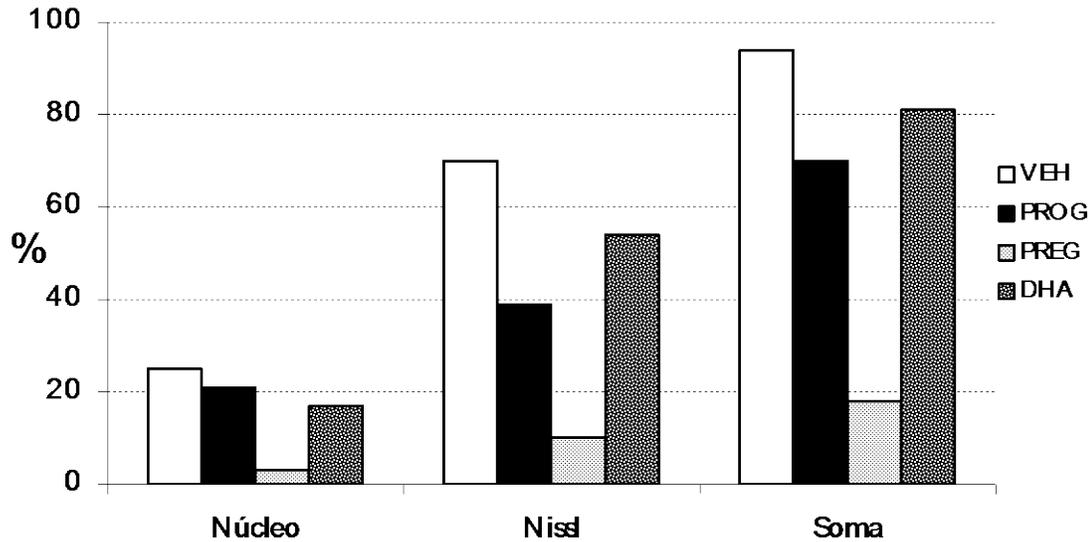
Para su análisis cuantitativo en respuesta a la axotomía, los resultados se expresaron en porcentaje con respecto al obtenido de las áreas somática, de Nissl y nuclear en relación a las áreas de animales control intacto (μm^2). Así, los valores promedio en cortes de conejos control-intacto de la *área nuclear* fueron de $154 \pm 45 \mu\text{m}^2$ (*desviación estándar*), *sustancia de Nissl* $328 \pm 98 \mu\text{m}^2$ y *soma neuronal* $740 \pm 199 \mu\text{m}^2$.

De esta manera, como resultado de la axotomía-tubulización, en el área nuclear se produjo un incremento promedio del 35% en los grupos de animales VEH, PROG ó DHA y por efecto de la PREG resultó el mínimo valor porcentual -10%. En la *Sustancia de Nissl*, los grupos VEH y experimentales mostraron un incremento porcentual del 60% al 77%, de éstos, el grupo tratado con PROG, reveló el más alto porcentaje. Del *soma neuronal* los mayores valores porcentuales obtenidos de los animales estudiados fueron del grupo de conejos tratados con PROG (63%) y los valores más bajos resultaron de los conejos tratados con PREG; sin embargo, ninguno de ellos mostró diferencias significativas ($p > 0.05$).

b. 45 días poslesión

Durante esta etapa, todos los animales tratados con neuroesteroides mostraron reducción de los valores porcentuales en las áreas nuclear, Nissl y somática; mientras que, el grupo de conejos control-VEH demostró el efecto opuesto, -incrementaron los valores porcentuales de las áreas Nissl y soma y fueron mayores de las obtenidas a los 15 días poslesión. En esta etapa, el grupo tratado con PREG, manifestó los valores mas reducidos en comparación con todos los demás grupos de animales VEH y experimentales (PROG ó DHA).

Fig. 74 Incremento porcentual del área nuclear, de Nissl y soma neuronal a 45 días poslesión.



Por otra parte, la tabla V muestra la razón soma/núcleo en relación al incremento de ambas estructuras por efecto de la axotomía-tubulización de la rama bucal del nervio facial a los 15 y 45 días. Durante las dos etapas estudiadas, los valores fueron mayores en los grupos tratados con PROG y PREG mostrando diferencias significativas con respecto al grupo de conejos VEH. La diferencia de volumen soma/núcleo, puede reflejar el aumento en la síntesis de proteínas condicionada por los neuroesteroides, para modular la regeneración nerviosa.

Los cambios morfológicos de la población neuronal en el NMNF lesionado por axotomía-tubulización, reflejan los resultados obtenidos en el análisis cuantitativo de las estructuras neuronales, se identificaron varios aspectos: 1. incremento del tamaño nuclear, sustancia de Nissl y soma, en las dos etapas analizadas 15 y 45 días poslesión; 2. alteración de la forma nuclear, sustancia de Nissl y soma en ambas etapas analizadas; 3. no se presentaron cambios morfológicos o cuantitativos significantes por efecto de los neuroesteroides, a excepción de PREG en la última etapa analizada y en el análisis de la relación soma/núcleo. 4. En todos los grupos analizados se observaron cambios morfológicos típicos en respuesta a lesión.

Tabla V. Razón soma/núcleo de neuronas axotomizadas tubulizadas del NMNF.

Grupo/días	15	45
INTACTO	4.8:1	
VEH	5.8:1	5.9:1
PROG	6.3:1 *	5.5:1 *
PREG	6.4:1 *	5.3:1 *
DHA	5.8:1	5.8:1

12.1 Análisis morfométrico mediante microscopía electrónica de transmisión en células gliales

Se procesaron 40 tallos cerebrales que incluían el NMNF de conejos machos castrados que se sometieron a axotomía tubulización de la rama bucal superior del nervio facial, las etapas examinadas fueron 15 y 45 días, los grupos estudiados fueron: un grupo VEH (*quitosana sin neuroesteroides*) y tres experimentales (*quitosana con PROG, PREG ó DHA*). En forma paralela se analizaron 12 tallos cerebrales de conejos machos no lesionados y no castrados (*controles intactos*).

De los NMNF incluidos en resinas, se obtuvieron cortes coronales de 60-80 nm de espesor, y de cada muestra se identificaron las células gliales: -astrocitos, oligodendrocitos y microglia; de ellas, se registró el área nuclear (μm^2) (Fig. 75, ab).

Morfología glial y análisis cuantitativo

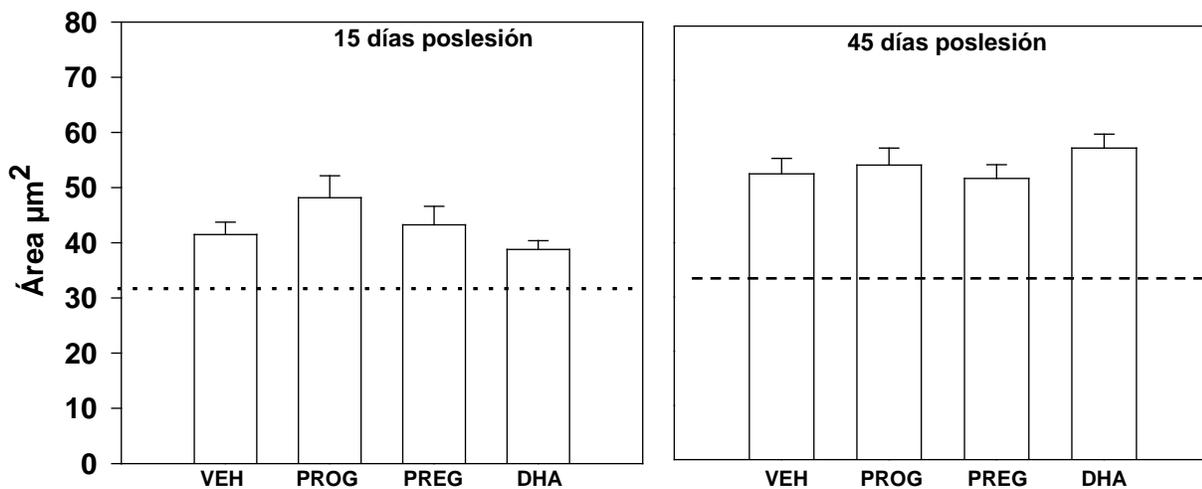
La morfología general del NMNF consistió de neuronas, axones, dendritas, sinapsis, y células gliales (Figs. 75-81). Las células gliales fueron similares a las descritas previamente en otras regiones del SNC (Peters y col., 1994). Las neuronas contenían un núcleo grande con un nucleolo electro-denso (Fig.76). Las células gliales de animales controles intacto y de los estudiados (VEH y experimentales) en las dos etapas analizadas 15 y 45 días poslesión, fueron localizadas en diferentes sitios, -perineurales, perivasculares e interfasciculares (Figs. 77-81). Los núcleos se distinguieron con facilidad, no así los límites del citoplasma; durante la primera etapa, en todos los grupos estudiados,

los núcleos de astrocitos, oligodendrocitos y microglia, aumentaron de tamaño en comparación al control intacto y fueron aun mayores a los 45 días poslesión.

Astroцитos

En los tejidos de animales VEH y experimentales se distinguieron *astroцитos* fibrosos y protoplasmáticos, identificados por la forma de su núcleo (alargada, en frijol y esférica) y por las características de los gránulos de cromatina en el nucleoplasma, homogénea en los fibrosos y heterogénea en los protoplasmáticos (Figs. 78,79). En promedio se analizaron 30 núcleos de astrocitos, por grupo y periodo. Durante las dos etapas, todos los grupos tratados VEH y con neuroesteroides mostraron incremento de los valores promedio del área nuclear, con respecto al control intacto ($p < 0.001$); sin embargo, no hubo diferencias significativas en relación al grupo VEH ($p < 0.05$), es decir; no se manifestaron efectos moduladores por la acción de los neuroesteroides (Fig. 82).

Fig. 82 Efectos de la axotomía-tubulización del nervio facial, sobre el área nuclear de astrocitos.



ANOVA "Tukey" $p < 0.001$ vs control. ANOVA $p > 0.05$ vs VEH. Los

La Fig. 82 muestra el área nuclear de astrocitos presentes en el NMF de conejos sacrificados a los 15 y 45 días poslesión. El valor promedio del área nuclear de los astrocitos controles intacto fue de $32 \pm 6 \mu\text{m}^2$ (media \pm desviación estándar). Durante la primera etapa, los astrocitos VEH y

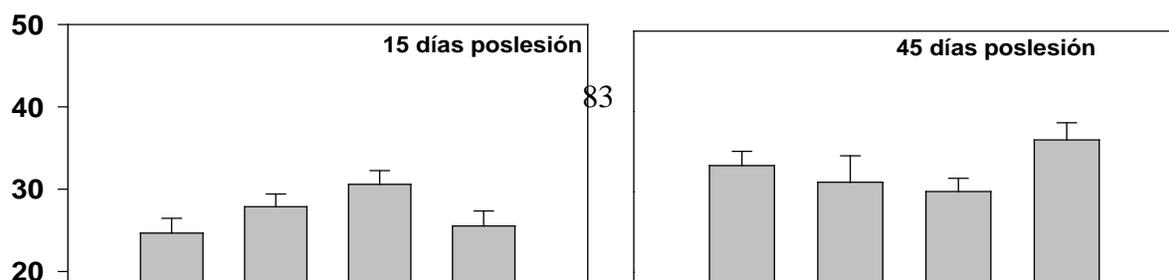
experimentales revelaron un incremento nuclear vs control intacto, entre 18% y 50%, el primero correspondió al grupo de conejos tratados con DHA y el segundo a PROG, respectivamente. A los 45 días el incremento nuclear fue mayor, el mayor porcentaje correspondió al grupo de animales tratados con DHA (78%) y el menor a los animales VEH (62%).

Oligodendrocitos

En los tejidos de animales VEH y experimentales se identificaron los núcleos de oligodendrocitos, característicos por su cromatina contenida en grumos, de densidad moderada, en comparación al aspecto electro-lúcido que presentan los astrocitos (Figs. 77-81), se observaron diversas formas nucleares, -esférico y oval, con localización perivascular, interfascicular y perineuronal. De cada grupo y etapa, se analizaron 21 núcleos de oligodendrocitos y de la misma manera que ocurrió con los astrocitos; durante las dos etapas, todos los grupos estudiados mostraron incremento de los valores promedio del área nuclear, con respecto al control intacto ($p < 0.001$); sin embargo, no hubo diferencias significativas entre el grupo VEH y los tratados con los neuroesteroides ($p < 0.05$) (Fig. 83).

El valor promedio del área nuclear en el control intacto fue de $19.9 \pm 4.7 \mu\text{m}^2$ (media \pm desviación estándar). A los 15 días posesión, los incrementos nucleares vs control intacto y los grupos estudiados fueron entre 20% y 50%, el mayor correspondió a los grupos tratados con PREG y el menor a conejos VEH, respectivamente; y a los 45 días fue mayor el incremento nuclear, el menor porcentaje se registró en el grupo tratado con PREG (50%) y el mayor (80%) para animales tratados con DHA (Fig. 83).

Fig. 83 Área nuclear de oligodendrocitos- efectos por axotomía tubulización del nervio facial.



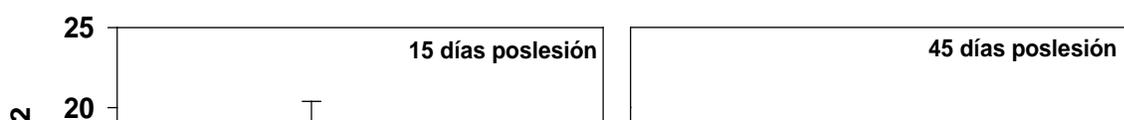
Área μm^2

Microglia

Fueron identificadas y caracterizadas en los tejidos de animales VEH y experimentales por su núcleo, -más electro-denso que los oligodendrocitos, la presencia de una cantidad mayor de grumos de cromatina en el nucleoplasma. Se observaron núcleos alargados, esféricos y ovales en sitios perineuronales, perivasculariales e interfasciculares, sin identificar características morfológicas distintivas entre los grupos analizados (Figs. 78-81).

En promedio se analizaron 15 núcleos por grupo y periodo. Durante la primera etapa (15 días), todos los grupos VEH y tratados con neuroesteroides mostraron un incremento hasta de un 100% de los valores promedio del área nuclear con respecto al control intacto ($p < 0.001$); sin embargo, a los 45 días, el área nuclear se redujo en los grupos tratados con neuroesteroides, mientras que, los grupos VEH sufrieron un efecto opuesto, es decir, se incrementó hasta un 97% el área nuclear con respecto al control intacto. A pesar del aumento progresivo en el área nuclear en los diferentes grupos estudiados, no hubo diferencias significativas entre los grupos VEH y tratados con neuroesteroides ($p < 0.05$), en ninguna de las dos etapas analizadas (Fig. 84).

Fig. 84 Efectos de la axotomía tubulización en el NMNF sobre el área nuclear en células de microglia.



DISCUSION

Las leyes de la neurogénesis son el estudio de muchos investigadores que trabajaron en el dominio del desarrollo normal , -Kupffer, His, Kölliker, Cajal, von Lenhossék, Retzius, Harrison, Hed, etc. – y de algunos otros que estudiaron la degeneración patológica y regeneración –Waller, Ranvier, Vanlair, Münzer, Strobe, Bethe, Perroncito, Cajal, Marinesco, Nageotte, Tello, O. Rossi, Dustin etc. (De Felipe y col., 1991). El trabajo actual se originó por los conocimientos obtenidos de la *Teoría del neurotropismo* (*νευρου*, nerve y *τροπή*, atracción) concepto introducido por Forsmann en 1900, teoría rectificada por Cajal en 1905 (Ramon y Cajal 1928; DeFelipe y col., 1991) y apoyada por los neurólogos anteriormente descritos; ellos demostraron que la regeneración de fibras nerviosas en el SN depende de la disponibilidad de factores de iniciación, de conos de crecimiento de axones dañados y de un microambiente que favorezca su elongación y guíe su crecimiento hacia las dianas originales (DeFelipe y col., 1991; Gudiño-Cabrera y col., 2000).

Este conocimiento se aplicó para inducir la regeneración nerviosa mediante el modelo de tubulización, -consistió en formar una cámara axónica con el biomaterial quitosana conteniendo en sus paredes neuroesteroides (PROG, PREG ó DHA), para facilitar el crecimiento axonal mediante su liberación “*in situ*”. Por otra parte, el nervio facial de conejos fue seleccionado por las siguientes razones: (a) las ramas bucales superior e inferior han sido de las más estudiadas, por la localización anatómica y su importante participación en la expresividad facial (Spector y col., 1991;1993), (b) es un nervio craneal y tiene menor capacidad regenerativa en comparación con los nervios periféricos (Yu y col., 1986; Jones y col., 1993,1997,1999) y (c) la necesidad de comparar los resultados con los obtenidos en el nervio ciático de la rata, ratones y hámsters lesionados por aplastamiento o congelamiento; en ellos, se ha descrito gran tolerancia inmunológica (Koenig y col., 1995,2000; Jones y col. 1997,1999).

Las propiedades especiales del biomaterial quitosana (baja toxicidad, catiónica, biodegradable, antimicrobiana), mostraron su utilidad en la reparación del nervio facial de conejos sometidos a axotomía y tubulizados mediante una prótesis de quitosana de 13 mm de longitud. Se demostró desde los primeros 15 días, en los extremos proximal y distal de los crecimientos nerviosos la presencia de fibras no mielinizadas asociadas en la gran mayoría con CS; y a los 45 días, las fibras nerviosas de ambos segmentos adquirieron distintos espesores en la vaina de mielina semejantes a los de un nervio intacto, particularmente en los tejidos de conejos tratados con neuroesteroides. Sin embargo, independientemente de los efectos neurotróficos de los neuroesteroides analizados en

este estudio, el biomaterial quitosana produjo mejores resultados que cuando se han usado materiales sintéticos (Spector y col., 1991ab, 1992, 1993; den Dunnen y col., 1993; 1996; Suzuki, 1999,2000).

CROMATOGRAFÍA DE GASES-LIBERACION DE NEUROESTEROIDE

Además de actuar como una cámara guía para el crecimiento axónico, la prótesis permitió la liberación prolongada del neuroesteroide contenido en su pared, cualidades importantes en la selección de biomateriales, para que sean capaces de liberar compuestos, o contener células vivas durante los estadios críticos del crecimiento nervioso (Hadlock y col., 1999; 2000), a fin de estimular directamente al nervio lesionado (Yu 1989; Spector y col., 1991; 1993; Koenig y col., 1995; 2000), sin efectos sistémicos (Kanje y col., 1988; Sjöberg y col., 1989; Mitsui y col., 1999).

Es importante que pueda regularse la tasa de liberación del contenido del biomaterial para lograr sus efectos en el período deseado; es decir, la vida biológica de una matriz es importante desde el punto de vista de la determinación de la duración del compuesto químico, esto puede resolverse al utilizarse diferentes clases de polímeros como matriz (Jamela y col., 1995; 1998).

Esta propiedad fue demostrada en el presente estudio por imágenes microscópicas obtenidas de las paredes de la prótesis de quitosana a los 15 y 45 días, mostraron, aumento de volumen y porosidad progresiva de sus paredes por el contacto con fluidos intersticiales; permitieron el crecimiento nervioso antes de su biodegradación y los diferentes patrones de organización nerviosa a causa de los efectos tróficos de los neuroesteroides reflejan su liberación desde sus paredes.

Se ha demostrado que la difusión de fármacos desde una matriz de quitosana puede controlarse a través de una matriz entrecruzada con aldehídos, en particular glutaraldehído (Jamela y col., 1995,1998). Sin embargo, en el presente trabajo, la dosis depositada de neuroesteroides fue suficiente para lograr la regeneración del nervio facial axotomizado. Por otra parte, la interacción creciente entre la prótesis y componentes celulares, aunada a la degradación enzimática, permite suponer que la quitosana terminará por desintegrarse completamente en los tejidos receptores, siendo capaz de liberar su contenido total durante un intervalo mayor de tiempo.

En el pasado los compuestos utilizados con éxito como vehículos de liberación controlada de esteroides fueron fabricados de copolímeros glicólico-láctido, el mecanismo de liberación se atribuyó al efecto combinado de difusión y bio-erosión de la matriz. Mas tarde, estudios *in vitro* e *in vivo* con

microesferas, conteniendo la hormona progesterona entrecruzada con glutaraldehído, demostraron que el mecanismo de liberación desde la matriz de quitosana es uniforme y predominantemente por difusión, en comparación con la matriz proteica y la compuesta de los polímeros glicólico-láctido (Felt, 1998; Jamela y col., 1998). Es posible que esto mismo haya sucedido en el presente trabajo, con el biomaterial quitosana utilizado en la regeneración del nervio facial, aunque por las imágenes microscópicas observadas en su paredes durante los diferentes tiempos de implantación podría sugerirse que además de la difusión, los neuroesteroides fueron liberados como resultado de la biodegradación de la matriz, eventos que han sucedido en estudios *in vivo* utilizando microesferas de quitosana, entrecruzadas con glutaraldehído para reducir la biodegradación en un tiempo determinado (Kas, 1997; Jamela y col., 1995, 1998).

Aunque en el presente estudio, el sistema de liberación no estuvo completamente optimizado para liberar la concentración ideal de cada neuroesteroide sobre un tiempo determinado, ambos resultados obtenidos de los estudios de implantación subcutánea y del nervio regenerado, consideran la posibilidad de implementar éste sistema de liberación controlada en la reparación de nervios periféricos.

Es importante señalar que, en las distintas aplicaciones biomédicas, se requieren materiales biodegradables que posean diferentes propiedades fisicoquímicas y cinética de biodegradación (Tomihata y col., 1996; Felt, 1998; Hadlock, 2000). En algunos casos, se requieren de materiales duros, con elevada fuerza mecánica y mínima tasa de degradación; en otras aplicaciones (quirúrgicas) son necesarios materiales blandos que sufran degradación con rapidez. Los polímeros sintéticos biodegradables (poliglicólicos, polilactatos) tienen elevada fuerza mecánica; sin embargo, es reducida en los polímeros naturales como, la colágena, aunque ésta presenta otras ventajas como, la adhesión celular. En particular, la quitosana biopolímero natural, se ha destacado por su elevada potencialidad de poseer propiedades mecánicas (Tomihata y col., 1996; Kas, 1997; Felt, 1998) y por los resultados obtenidos en el presente estudio, ha demostrado su utilidad como prótesis nerviosa en la reparación de nervios seccionados.

ESTUDIOS HISTOLOGICOS

Un resultado favorable de las prótesis de quitosana utilizadas en el presente estudio, fue la moderada reacción inflamatoria, obtenida en los diferentes estadios de implantación sc, como en el

nervio facial. Por otra parte, las prótesis de quitosana no presentaron encapsulación fibrosa y manifestaciones de rechazo. La aceptable respuesta de la quitosana frente al tejido tisular, conducen a su posible utilidad en la reparación de nervios periféricos y en otras áreas que requieren la necesidad de cubrir defectos tisulares (hueso, cartílago, arterias venas); además, de ser útiles como vehículo de liberación de sustancias en el sitio de lesión, -su utilidad esta limitada a la creatividad de la ingeniería biomédica.

Normalmente, el huésped reacciona contra el órgano o prótesis implantado de forma específica e inespecífica. La reacción inespecífica es la inflamación y se localiza preferentemente en el sitio de implantación (Mateos-Rodríguez y col., 1998). La reacción inflamatoria puede ser paroxística o leve, dependiendo de las propiedades físico-químicas del polímero. Cuando la reacción inflamatoria es moderada, se producen efectos benéficos al reabsorberse tempranamente (Peluso y col., 1994; Regueiro, 1997), pero, cuando la respuesta inflamatoria es severa, ésta produce excesivos agentes hidrolizantes y oxidantes, producidos por macrófagos, monocitos y otros; éstos desencadenan eventos que finalmente destruyen el tejido que las rodea (Bloom, 1996; Anderson, 1988). Los mismos eventos inflamatorios pueden observarse con la implantación de polímeros naturales que, característicamente activan leucocitos (Remes y col., 1992; Segura-Egea, 1998). La reacción inflamatoria constante condiciona que el polímero se biodegrade con mayor rapidez (Peluso y col., 1994; Mateo-Rodríguez, 1998).

Por otra parte, se demostró que la quitina y sus derivados al implantarse *sc*, producen moderada reacción inflamatoria; ésta reacción tisular es mínima cuando la desacetilación de la quitina es completa (quitosana); lo que implica que, la desacetilación modifica la resistencia mecánica de la quitina y reduce la reacción tisular inflamatoria (Tomihata y col., 1997; Felt, 1998). Se conoce que la rápida biodegradación del polímero, ejerce una reacción inflamatoria aguda a causa de la abundante producción de compuestos de bajo peso molecular acumulados a corto plazo en el sitio de implantación y demostrado por la presencia de granulocitos alrededor del implante, probablemente fagocitando los productos de degradación. Si la biodegradación es lenta, la respuesta tisular es moderada, similar a la que sucede cuando se utilizan biomateriales no biodegradables, los cuales no secretan compuestos reconocibles por células fagocíticas y finalmente encapsulan el implante con material fibroso. Se ha señalado que los grupos catiónicos sobre las superficies de los materiales atraen fuertemente la adhesión celular provocando una reacción inflamatoria severa cuando son implantados; sin embargo, a pesar que la estructura química de la quitosana, posee aminas primarias

catiónicas en cada unidad, el potencial zeta que posee, condiciona que la quitosana sea bionerte y no desencadene ningún estímulo al tejido que la rodea (Tomihata y col., 1997; Hadlock, 2000).

Una de las desventajas de los polímeros no biodegradables, -como polietileno, silicona y politetrafluoretileno es la fuerte reacción inflamatoria que provocan, a causa de las características de superficie y el contacto a largo plazo en los tejidos; en cambio, los materiales biodegradables, producen el efecto opuesto, -mínima respuesta inflamatoria por el tiempo que permanecen en el sitio de implantación, a causa de su degradación.

REGENERACIÓN DEL NERVIOS FACIAL AXOTOMIZADO-TUBULIZADO

Uno de los resultados mas sobresalientes en la regeneración nerviosa, con el uso de biomateriales, ha sido la reparación exitosa de lesiones con solución de continuidad mayor de 1 cm, en especies animales mayores que los roedores. Este efecto, no se consiguió cuando fueron utilizados materiales sintéticos como la silicona (Suzuki y col., 1999, 2000). En éstas circunstancias, se logró un porcentaje de éxito entre el 60-80%, al reparar el nervio ciático de la rata y facial del conejo con silicona en lesiones con solución de continuidad de 10 mm de longitud y la adición de sustancias introducidas en el interior de las cámaras (solución salina, citocromo, NFG, plasma etc.,) (Williams y col., 1987; Chen y col., 1989; Spector y col., 1991, 1992ab, 1993).

Uno de los mecanismos que explican el éxito obtenido con materiales biodegradables y de la quitosana utilizada en el presente estudio, es la excelente permeabilidad de sus paredes; con ello, se facilita la difusión de nutrientes y otras señales químicas desde los tejidos circundantes, favoreciendo el crecimiento nervioso y la integración gradual de la prótesis (den Dunnen y col., 1996; Hadlock, 2000; Lundbrog, 2000).

El primer criterio evaluado en el presente estudio fue el porcentaje de éxito de crecimientos nerviosos en prótesis de quitosana de 13 mm de longitud conteniendo una cámara axónica de 10 mm de longitud. De todos los grupos estudiados, los mejores resultados se lograron con el grupo de conejos tratados con PROG, se obtuvo de cada periodo el 100% de los crecimientos nerviosos. El éxito, difiere principalmente del grupo VEH, lo que indica la posible contribución de la PROG desde los primeros días de la axotomía. Es posible que, desde los primeros días posterior a la axotomía, la PROG exógena haya actuado a través del *neurotropismo* (DeFelipe y col., 1991; Spector y col., 1993), como sustancia trófica iniciadora u orientadora de fibras nerviosas.

Por otra parte, los fracasos obtenidos o la ausencia de los crecimientos nerviosos en los grupos estudiados, pueden deberse a la presencia del *neurotropismo negativo* descrito por Lugaro, Nageotte y Marinesco (1905), que explica la parálisis, desvío y atrofia de fibras nerviosas por la presencia de obstáculos mecánicos como, -sangre, pus, toxinas bacterianas o sustancias inhibitorias del crecimiento axónico (DeFelipe y col., 1991).

El proceso regenerativo de las fibras nerviosas periféricas y del SNC interrumpido por traumatismo o toxicidad, representa un patrón de eventos reproducibles, donde interviene la integración y cooperación de varios componentes humorales y celulares para reconstruir las fibras axotomizadas (Fields y cols., 1989; Spector y col., 1991; den Dunnen, 1996). De todos los nervios axotomizados y tubulizados con prótesis de quitosana y neuroesteroides, en el 87.5% se demostró la presencia de los 5 estadios regenerativos que suceden después de la axotomía-tubulización de nervios periféricos, -respuesta postraumática, migración celular y prolongaciones celulares, diferenciación de elementos vasculares, neuronales y gliales, crecimiento axonal y mielinización; el resto de los cables tisulares contenían células de origen mesodérmico (fibroblastos, macrófagos y células endoteliales), que consideramos como cicatriz y causa de fracaso regenerativo. El desarrollo excesivo de tejido conectivo fibroso, es un impedimento para lograr la regeneración, la fibrosis impide el desplazamiento del cono de crecimiento y sus rebrotes axónicos y finalmente las fibras nerviosas se desvían y atrofian (DeFelipe y col., 1991; Spector y col., 1991, 1992ab, 1993; Campbell, 1992; Dezawa, 2000).

Al analizar las estirpes celulares en los crecimientos nerviosos durante los dos periodos estudiados, se distinguió la presencia de células (eosinófilos, neutrófilos y células plasmáticas), que no han sido identificadas en estudios similares. Sin embargo, su presencia durante los primeros 15 días y ausencia a los 45 días poslesión, refleja la respuesta inflamatoria, que normalmente acontece en los tejidos posterior al implante. De las células analizadas entre los grupos estudiados, los macrófagos mostraron un incremento significativo en los conejos tratados con PROG, que difirió del grupo VEH. Este efecto, puede sumarse al éxito obtenido en el proceso regenerativo de nervios tratados con PROG, ya que se conoce, que los macrófagos activados secretan numerosos factores de crecimiento como el NGF, FGF, y el factor de crecimiento derivado de las plaquetas (PGF) (den Dunnen y col., 1996; Dezawa, 2000); ellos, tienen influencia en el crecimiento de las fibras nerviosas y en el proceso de remielinización.

Por otra parte, distintas investigaciones demostraron, que la quitosana y los macrófagos poseen receptores para manosa y glucoproteínas N-acetil-glucosamina (NAGA); así, la quitosana

estimula los macrófagos al actuar en las uniones NAGA y pudiera ser uno de los mecanismos para modular la activación de macrófagos (Schlesinger y cols., 1980; Peluso, 1994; Dezawa, 2000).

Otras estirpes celulares identificadas en los crecimientos nerviosos, fueron los fibroblastos. La morfología de sus prolongaciones citoplasmáticas, parece suponer, que forman un andamiaje trabecular, el cual es dispuesto longitudinalmente entre los segmentos nervios proximal y distal. Este evento es fundamental en el proceso de regeneración nervioso. De acuerdo a la *Teoría de vías pre-establecidas* de His y Ranvier, establece la existencia del origen mesodérmico en la regeneración nerviosa, indispensable para que las fibras nerviosas sigan el sistema de células conductoras (vías establecidas) sin error de desviación (DeFelipe y col., 1991; Campbel, 1992; Weinstein, 1999).

Por otra parte, en todos los crecimientos nerviosos se identificaron vasos sanguíneos funcionales y en formación (gemación), éstos últimos, se caracterizaron por pequeños brotes ramificados con luz y en algunos se distinguieron signos de circulación. La mayoría de los vasos contenían una membrana basal a su alrededor, lo que establece la presencia de pericitos (Alonso y col., 1997). La vasculogénesis, es elemental durante el proceso regenerativo, por las demandas metabólicas y dependencia del oxígeno como consecuencia de la inadecuada vascularización del tejido que inicia a regenerarse (Campbell, 1992; Zhao y col., 1992). Es posible que uno de los factores de fracaso en los cables tisulares donde no se observaron fibras nerviosas, se haya debido a la ausencia de redes vasculares.

Hasta aquí, se ha mostrado que el inicio de la regeneración entre dos segmentos nerviosos, empieza con el establecimiento de una matriz de fibroblastos conteniendo una variedad de células inflamatorias; más tarde, la matriz es invadida por capilares, CS y axones regenerados y gradualmente, desaparecen las células iniciadoras (mesodérmicas) (Spector y col., 1992; Zhao y col., 1992; Kirsch, 1998).

El objetivo de aplicar neuroesteroides en el proceso regenerativo, fue para facilitar la reparación del nervio facial del conejo, a través de sus acciones neurotróficas: proliferación de SC, producción de factores neurotróficos, incremento del número de fibras nerviosas, crecimiento axónico y remielinización (Baulieu y col., 1997, 2000; Svenningsen y col., 1999; Zorumski, 2000). En el presente estudio, se apoyan los efectos neurotróficos de los neuroesteroides en el nervio facial regenerado del conejo axotomizado y tubulizado a los 15 y 45 días, en particular con el neuroesteroide PROG. Con el se obtuvo el mayor número de *fibras no mielinizadas* en contacto o envainadas con *células de Schwann, fibras mielinizadas, mayores diámetros y proporción “n” y “g”*, en comparación con los crecimientos nerviosos de animales ausentes del tratamiento con neuroesteroides (VEH).

A los 15 días posteriores a la axotomía, se mostró que las fibras nerviosas regeneradas alcanzaron el segmento nervioso distal, efecto demostrado al observar fibras nerviosas en ambos segmentos nerviosos, aunque más numerosas en el proximal, lo que hace suponer que las fibras nerviosas finalmente alcanzarán el órgano diana. Evento explicado por el estímulo químico del neurotropismo (De Felipe y col., 1991), donde las fibras nerviosas regeneradas son atraídas por los factores neurotróficos producidos y liberados del segmento distal por el complejo CS-axón (Zhao y col., 1992; Weinstein, 1999; Dezawa, 2000). Por otra parte, es posible que la calidad de regeneración obtenida en los crecimientos nerviosos tratados con neuroesteroides, se explique por el aumento de CS observadas en el segmento nervioso distal, con ello, se desencadenaría la cascada de eventos que sucede con el complejo CS/axón (producción de factores neurotróficos, señalamiento neuronal retrógrado y mielinización) (Dezawa, 2000). Adicionalmente, se demostró la presencia de fibras regeneradas mielinizadas y premielinizadas provenientes del segmento proximal en los nervios tratados con PROG. Es posible que uno de los mecanismos por el cual, se observó el efecto de mielinización en el grupo PROG, se haya debido a receptores específicos de PROG (PR)-localizados en SC (Desarnaud, 1998; Koenig, 2000).

En este mismo periodo de 15 días, se obtuvo la mejor organización fascicular en los crecimientos tratados con neuroesteroides, en particular con PROG, en ellos se distinguieron numerosas CS y fibras no mielinizadas. Para la etapa analizada, reflejan un nervio cualitativamente maduro y puede decirse que, la prótesis de quitosana con neuroesteroides produjo una regeneración mas rápida comparada con los nervios VEH. Además, nuestros resultados son congruentes de los obtenidos en estudios previos, donde la morfología de los nervios regenerados, fue similar al final de la 3era semana de provocar lesión con solución de continuidad de 10 mm en el nervio facial del conejo tubulizado con silicona y el ciático de la rata con los polímeros sintéticos ácido-poli-láctico y poli-glicólico (Spector y col., 1991; den Dunnen y col., 1996; 2000; Hadlock, 2000).

Generalmente, durante los primeros 45 días de axotomía, todos los crecimientos nerviosos mostraron una organización morfológica diferente a la observada en la etapa temprana. Los tejidos de animales tratados con neuroesteroides, reflejaron mayor organización nerviosa en comparación con los animales VEH; en particular, los tejidos tratados con PROG. Este grupo, sobresalió significativamente al obtener los mayores valores promedio en los parámetros señalados, cuando fue comparado con VEH, PREG y DHA. Además, uno de sus resultados más sobresaliente cuando se comparó con el control intacto, fue el incremento del 83% de fibras mielinizadas *por área* analizada.

Sin embargo, en ninguno de los grupos estudiados, se alcanzaron los valores del control intacto con respecto a la proporción “n”, “g”, diámetro y área de la fibra mielinizada.

En general, el nervio regenerado no logra los valores electrofisiológicos y morfológicos de un nervio normal (Gilchrist y col., 1998; Lawson y col., 1998; Hadlock, 2000). Sin embargo, los crecimientos nerviosos tratados con PROG, mostraron una apariencia regenerativa organizada y madura, aunque difirieron cuantitativamente de los nervios controles intactos. No obstante, de que en el periodo analizado (45 días) el proceso regenerativo no se ha completado. Estos resultados, muestran una vez más, el efecto neurotrófico de los neuroesteroides en la regeneración nerviosa; mientras que, los tejidos de animales VEH, quienes no recibieron neuroesteroides, revelaron en sus crecimientos nervioso, una organización estructural indicativa de inmadurez nerviosa.

Los crecimientos nerviosos analizados a los 45 días posterior a la axotomía con la utilización de prótesis de quitosana y neuroesteroides, muestran un patrón regenerativo semejante al reportado de otros autores. La utilización de prótesis biodegradables de los polímeros sintéticos: poli-lactatos y poli-glicólidos con depósito entre sus paredes de CS y sustancias neurotróficas (neurotropina) (Hadlock, 1998, 1999), produjeron hasta la décima semana, elevada proporción “n” y fibras mielinizadas en el nervio ciático de ratas (Hadlock y col., 1998,1999,2000). Los polímeros poli-lactatos ϵ -caprolactona utilizados como guías nerviosas en el nervio ciático de rata, mostraron en la tercera semana fibras mielinizadas y a los 2 años, el nervio regenerado fue semejante a un nervio normal (den Dunnen y col., 1993;1996;2000). Con prótesis de polímeros inorgánicos, se obtuvieron registros electrofisiológicos excelentes en reparaciones termino-terminal del nervio facial de ovejas (Gilchrist y col., 1998); y las prótesis de quitosana mostraron fibras mielinizadas y elevada proporción “g” y “n” a los 45 días de haberse producido lesión con pérdida de solución de continuidad de 10 mm en el nervio facial de conejos.

Estos resultados, demuestran la diferencia de regeneración nerviosa, con el uso de materiales sintéticos y biodegradables; éstos últimos poseen mayor permeabilidad (Spector y col., 1992; Aebischer y col., 1988; den Dunnen y col., 1996; 2000), lo que permiten la difusión de nutrientes como, glucosa, oxígeno etc., factores promotores de crecimiento provenientes de tejidos adyacentes (factores cicatrizantes) y se eliminan productos de desecho (den Dunnen y col., 1993 1996, 2000). Estos mecanismos se propusieron como causa de fracaso o de éxito en la regeneración de nervios tubulizados con materiales sintéticos (Spector y col., 1991, 1992 1993; den Dunnen y col., 1996).

Otras diferencias en la velocidad de crecimiento y calidad del proceso regenerativo de nervios tubulizados son el tipo del biomaterial, métodos de implantación (CS), sustancias neurotróficas; ó los posibles mecanismos de difusión de nutrientes y factores de crecimiento (Aebischer y col., 1988; den Dunnen y col., 1996; 2000; Hadlock y col., 1999; 2000). Sin embargo, nuestros resultados fueron muy similares a los encontrados con el uso de biomateriales.

Por otra parte, para facilitar la regeneración nerviosa, en el interior de cámaras axónicas se han adicionado diversas sustancias con funciones neurotróficas (citocromo, NGF, IGF-I, PROG) y los nervios regenerados raramente fueron comparables al nervio normal (Spector y col., 1992ab). Sin embargo, desde la década de los años 80, diferentes estudios demostraron los efectos benéficos de neuroesteroides en el tejido nervioso lesionado, sus mecanismos de acción se realizan mediante dos tipos de receptores: 1) *Receptores citoplasmáticos o de acción genómica*, -ligan las moléculas esteroideas a receptores nucleares, actuando a nivel nuclear sobre los factores de transcripción y transducción de ácidos nucleicos para modular la síntesis proteica, se caracterizan por producir sus efectos celulares a largo plazo; 2) *Receptores de membrana o de acción no genómica*, presentan acción específica sobre la membrana, dada la ubicación de estos receptores sus efectos celulares están relacionados a la modificación de la conducción iónica celular y a diferencia de los anteriores, sus efectos son a corto plazo y rápidos (López-Mato y col., 1999; Baulieu, 2000; Zorumski, 2000).

Sin embargo, solo en cultivos de células gliales (oligodendrocitos y astrocitos) de ratas se identificaron receptores para progesterona (RP), glucocorticoides (RG), estrógenos (RE) y andrógenos (RA) (Jung-Testas y col., 1994, 1996; Engel, 2001) y se desconocen receptores específicos para DHA y sus mecanismos de acción sobre otros receptores (López-Mato y col., 1999; Friess, 2000). En CS, solo se demostraron RP mediante inmunofluorescencia indirecta, inmunocitoquímica y RCP-TR (Jung-Testas y col., 1996; Koenig y cols., 1995, 2000).

Para explicar los mecanismos de acción de los neuroesteroides (PREG ó PROG), en la regeneración de nervios periféricos, Koenig y col., utilizaron el nervio ciático del ratón lesionado por congelación, inhibieron la síntesis de PROG con trilostan, (inhibidor de la conversión PREG a PROG) y bloquearon los PR con RU-486 (competitivo antagonista de sus receptores), de esta manera, demostraron la síntesis *de novo* de PROG y su mecanismo de acción en la reparación de mielina (Koenig y col., 1995; 2000). En el presente estudio, el grupo de conejos que logró la mejor organización estructural en los dos periodos analizados fueron los tratados con PROG. Estudios previos describieron los posibles mecanismos de acción:

1) La PROG al sintetizarse por CS a partir de PREG, puede actuar por vía retrógrada y activar la expresión de moléculas de señalamiento neuronal requeridas para la proliferación de CS, factores neurotróficos (*NGF*, *NT-3*, *CBTF*, *BDNF*, *FGF1*, *FGF2*, *IGF1*, *IGF2*) y la resultante mielinización (Koenig y col., 1995, 2000; Kristijan y col., 1999; Weinstein, 1999; Baulieu, 2000); 2) alternativamente la PROG puede actuar de manera autocrina y modular directamente la síntesis de mielina (Baulieu y col., 1997, 2000); 3) al demostrarse la presencia de RP en CS, se consideró que la PROG promueve la mielinización al activar los genes específicos de proteínas de mielina (*PO* y *PMP22*) elementales en la síntesis de mielina (Suter y Snipes 1995; Garbay y col., 2000); 4) la estimulación del crecimiento axónico puede modularse por el metabolito de PROG, 5α -THP a través de receptores $GABA_A$ (Koenig y col., 2000; Zorumski, 2000).

Hasta el momento, no hay evidencias que demuestren receptores en CS para PREG o algún mecanismo de acción sobre la reparación de nervios periféricos; se conoce que su concentración se eleva de 5 a 10 veces de los valores plasmáticos (~ 10 ng/g) a partir de los 15 días de haberse producido congelación del nervio ciático del ratón, momento donde las CS están activadas mielinizando fibras nerviosas regeneradas; además, se ha demostrado que la aplicación de PREG y PROG aumentan el número de lamelas de mielina ($>$ de 20) y presenta el efecto opuesto al inhibirlas (Koenig y col., 1995, 2000; Baulieu y col., 1996, 2000). ¿Como explicar su mecanismo de acción en ausencia de receptores específicos para PREG y los resultados que se obtuvieron en crecimientos nerviosos tratados con PREG? es posible que hayan actuado a través de los metabolitos 5α -DHP y $3\alpha,5\alpha$ -THP, después de la conversión de PREG-PROG por la enzima 3β -HSD presente en CS (Koenig y col., 1995, 2000; Robel y col., 1995; Baulieu y col., 1997,2000; Engel, 2001).

Por otra parte, en el SNC, la síntesis *de novo* de DHA presenta funciones relevantes en el tejido nervioso lesionado (neuromoduladoras, neurotróficas y cambios en memoria y aprendizaje). (Friess, 2000). Sin embargo, en nervios periféricos, no está descrita la existencia de receptores DHA ó efectos neuro-reparativos, no obstante de detectarse niveles elevados en condiciones normales, en el nervio ciático del humano (Morfin y col., 1992). El mecanismo de sus actividades y efectos sobre la reparación de los crecimientos nerviosos puede ser diverso, incluyen acciones directas, al actuar a nivel nuclear sobre los factores de transcripción y transducción de ácidos nucleicos, a través de efectos indirectos modulados por sus metabolitos por receptores ionotrópicos o $GABA_A$, ó por metabolitos productos de la conversión de PREG a DHA (Zwain y col., 1999; Baulieu, 2000; Zorumski, 2000; Engel, 2001). Sin embargo, hasta el momento no ha sido determinado el mecanismo preciso que

compromete la reparación de nervios periféricos; es probable que sus efectos se deban a la testosterona derivada de la transformación enzimática.

Finalmente, la diversidad de resultados generados en el estudio de la regeneración nerviosa, con distintas especies animales (ratas, ratones, hámsters, conejos, gatos, perros, ovejas y primates), tipos de lesión (aplastamiento, sección, congelación) y metodología morfométrica; hacen difícil comparar los resultados. Sin embargo, los modelos de lesión química o por aplastamiento, tienen mejor pronóstico y proceso regenerativo porque conservan la continuidad del tubo endoneural y la lámina basal de las CS (Baulieu y col., 1997; Koenig; 2000); en cambio, no sucede lo mismo, cuando se secciona la totalidad del nervio y se crea un defecto nervioso, aquí, la continuidad nerviosa se establece mediante el injerto, técnica reparativa sujeta a desarrollar fibrosis y disfunción nerviosa.

EFFECTOS GLIALES Y NEURONALES EN EL NMNF AXOTOMIZADO

En general, no fueron observados cambios morfológicos significativos por la administración de PROG, PREG ó DHA en neuronas y células gliales analizadas a los 15 y 45 días de la axotomía-tubulización de la rama bucal superior del nervio facial. Sin embargo, todos los grupos estudiados inclusive el control VEH, expresaron cambios en la integridad citoesquelética, -características morfológicas tradicionales que suceden posterior a lesión (Svensson, 1993; Kreutzberg, 1995; Nakajima, 1996; Jones, 1997;1999).

Aunque no se evidenció pérdida neuronal, ellas presentaron edema somático, cromatolisis y excentricidad nuclear; éstos cambios se modificaron a los 45 días y corresponden a la respuesta anabólica de las neuronas; es decir, el inicio de la reorganización del NMNF después de la axotomía de sus fibras (Kazuyuki y col.,1996). A excepción del grupo tratado con PREG, que manifestó reducción del área nuclear en la etapa tardía, el resto de los grupos tratados con neuroesteroides no difirieron del control VEH.

Por otra parte, poco se conoce de los cambios ultraestructurales en células gliales del NMNF posterior a axotomía; en el presente estudio se analizó el área nuclear de astrocitos, oligodendrocitos y microglia como medida de respuesta a lesión y se demostró que la axotomía *per se* induce

incremento del área nuclear, misma que no fue modificada por la administración de neuroesteroides. Estos resultados muestran que, la axotomía de la rama bucal superior del nervio facial produce cambios en neuronas y células gliales del NMNF, demostrados al comparar los valores promedios de las estructuras del control intacto; sin embargo, no fueron modificados con la administración de neuroesteroides.

En neuronas maduras, la axotomía produce alteraciones en el sistema biosintético de proteínas y típicamente induce cambios morfológicos en el retículo endoplásmico, núcleo y nucleolo (McLoon, 1981). Los asociados con los organelos, son indicativos de cambios metabólicos que reflejan la respuesta anabólica o reparativa del axón (McLoon, 1981; Jones y col., 1997, 1999). El nucleolo, esta involucrado directamente con la síntesis de ARNr e indirectamente en la síntesis de proteínas (Jones y cols., 1986, 1999; Melgacani, 1999), lo que determina la capacidad regenerativa de neuronas (Jones y cols., 1986; Melgacani, 1999). Otros cambios incluyen, desplazamiento de sinapsis del cuerpo neuronal (Kazuyuki y col., 1996), activación microglial, proliferación y migración (Streit y col., 1999, Stoll, 1999), hipertrofia astrocitaria y aumento de sus núcleos (Peters y col., 1995; Jones, 1986, 1999).

Algunos de esos cambios, fueron demostrados en nuestros experimentos realizados en el NMNF axotomizado; sin embargo, no fueron convincentes para aprobar la hipótesis inicialmente propuesta. En los grupos tratados con neuroesteroides, se esperaban cambios morfológicos en neuronas y glia con respecto al grupo control VEH; de ésta manera, los resultados parecen contradecir los efectos neuroprotectivos (*modulan la excitabilidad neuronal, ejercen efectos tróficos sobre neuronas y glia y promueven la regeneración en nervios periféricos*) de los neuroesteroides en el tejido nervioso adulto lesionado (García-Segura y col., 1996; Fawcett y col., 1999; Baulieu y col., 1996, 1997, 2000).

A pesar que esta bien documentado el fenómeno de muerte neuronal posterior a axotomía, se desconocen sus mecanismos o causas. En ratas adultas (machos y hembras) cada NMNF contiene aproximadamente 5000 neuronas (Yu, 1988;1989), después de la axotomía, se identifican cambios morfológicos y cuantitativos entre el lado lesionado y el contralateral (Kinderman y col., 1994). Cuando los nervios facial e hipogloso son axotomizados, se presenta pérdida neuronal en los núcleos motores correspondientes (Svensson, 1993; Yu, 1988;1989). Además, la severidad del daño es dependiente del sexo, -en machos la pérdida neuronal oscila entre 10-18%, en las hembras se incrementa al doble 25-30% y en machos castrados, la pérdida neuronal es más severa que en hembras (Yu, 1988; 1989) estos resultados sugieren que la viabilidad de las motoneuronas axotomizadas está influenciada por el estado

hormonal (Guennoun, 1997). Los resultados obtenidos en el presente estudio, son diferentes a los reportados, es probable que ésta diferencia sea debida a los distintos métodos de cuantificación.

Por lo anterior, se ha demostrado que los esteroides gonadales andrógenos, disminuyen la muerte neuronal al actuar sobre RA localizados en las motoneuronas de nervios craneales y en los órganos diana (Yu, 1988; 1989; Guennoun, 1997). Además, la administración de testosterona en hámsters machos eleva el ARNr en neuronas, acelera la recuperación funcional de la parálisis facial inducida por aplastamiento del nervio facial a nivel del foramen estilomastoideo, el anti-andrógeno flutamida elimina su recuperación (Kujawa, 1989; Jones, 1993;1997). En general, los andrógenos y estrógenos aceleran la regeneración del nervio facial; los primeros tiene efectos iniciales sobre el programa molecular de motoneuronas faciales lesionadas y los estrógenos son los responsables de las acciones sobre GFAP y velocidad de crecimiento (Jones y col., 1999). Con la administración de PROG, se obtuvieron resultados similares, aunque no hay evidencias hasta el momento de receptores para PROG en el NMNF, se discute si la PROG es efectiva por si misma o sus efectos se deben a testosterona derivada de la transformación enzimática (Yu y col., 1989).

Estudios realizados en conejos demostraron que a partir de la tercera y quinta semana de axotomizar sus fibras faciales, se produjeron alteraciones estructurales en el soma neuronal (edema y ausencia visual de dendritas), siete semanas mas tarde, volvieron a su aspecto normal (Wang-Bennet y col., 1990). Otros estudios describieron cambios morfológicos en núcleo y nucleolo de neuronas inmaduras y maduras posterior a la axotomía. En las primeras, no sucedieron cambios nucleares significativos, presentan su máxima capacidad sintética y aumentan su producción metabólica en respuesta a lesión (Jones y col., 1986). En cambio, las neuronas maduras presentan diferentes condiciones metabólicas y alteran significativamente su estado metabólico en respuesta a lesión (MacLoon, 1981; Guennoun, 1997).

Efectos similares se presentaron en nuestro estudio, desde los primeros 15 días de lesión, todos los grupos estudiados, presentaron temporalmente cambios morfológicos en núcleo, sustancia Nissl y soma neuronal, logrando una morfología cercana a la normal a la sexta semana de la axotomía. Las únicas diferencias morfológicas encontradas entre los diferentes grupos estudiados correspondieron al tamaño nuclear del grupo PREG (Yu, 1986, 1989; Kinderman y col., 1994; Baulieu, 2000; Engel, 2001). Además, la naturaleza de la lesión y las variaciones de las especies utilizadas en los diferentes estudios, pueden influir en la morfología en respuesta a lesión (Guennoun, 1997; Jones y col., 1986, 1999; Dezawa, 2000).

Por otra parte, las células gliales expresan receptores nucleares para hormonas esteroides y pueden sintetizar *de novo*, PREG, PROG y sus metabolitos 5α -DHP y $3\alpha,5\alpha$ -THP (di Michele y col., 2000; Engel, 2001), ellas modifican sus funciones modulando genes de la expresión por receptores intracelulares (5α -DHP y PROG), o por interacción con receptores de membrana como GABA_A ($3\alpha,5\alpha$ -THP), mientras que PREG actúa probablemente como precursor (di Michele y col., 2000; Engel, 2001). Por otra parte, PROG ó DHA estimulan los niveles de ARNm de la GFAP, aunque existe la posibilidad de demostrar que la molécula efectiva es DHP y no PROG, su actividad puede deberse al convertirse a DHP.

Diferentes efectos poseen los neuroesteroides sobre la morfología *astroglial*, estudios *in vitro* demostraron que DHA modifica la diferenciación y transformación astroglial (Del cerro y col., 1995; Friess, 2000); PREG modula la extensión de las prolongaciones inmunoreactivas-GFAP (Del cerro y col., 1995; Engel, 2001); mientras que, PROG, PREG, DHA, testosterona (T) y 17β -estradiol reducen significativamente la inmunoreactividad-GFAP en los sitios de lesión (García-Segura y col., 1996; García-Estrada y col., 1998). Con respecto a *oligodendrocitos*, no hay reportes de estudios morfológicos y farmacológicos en núcleos motores de nervios axotomizados; sin embargo, en secciones totales de medula espinal, se demostró a nivel celular y molecular, elevación de marcadores específicos, -CNP (proteína inmadura que expresan los oligodendrocitos inmaduros) y MBP -específica de oligodendrocitos maduros (Morin-Richaud y col., 1998; Dezawa, 1999, 2000).

Hasta el momento, se desconocen los efectos modulatorios de neuroesteroides y esteroides gonadales sobre la respuesta microglial en lesiones traumáticas de nervios periféricos (Jones y col., 1999; Ramírez-Expósito, 1999; Streit, 1999). Esta demostrado que, el NMNF presenta reactividad microglial en respuesta a la axotomía de sus fibras (Graeber y Kreutzberg, 1988; Nakajima, 1996) ellas están involucradas en la reparación ó regeneración del daño neuronal por varios mecanismos: 1) producción de factores tróficos (citocinas y factores de crecimiento) (Jones y col., 1999; Dezawa, 2000); 2) deaferentación, 3) activación de astrocitos (Dezawa, 2000). Sin embargo, hasta el presente se desconocen los efectos que puedan ejercer las hormonas gonadales y neuroesteroides sobre la respuesta microglial en núcleos motores axotomizados; aunque por cultivos microgliales se ha establecido la existencia de receptores para glucocorticoides y mineralocorticoides (Stoll, 1999).

Toda la información referida anteriormente, apoyan los efectos neurotróficos de los neuroesteroides; son capaces de influir en el aspecto morfológico de astrocitos y microglia al actuar sobre receptores y alterando sus funciones metabólicas. Sin embargo, los nuevos resultados que

emergen de nuestros experimentos indican que, los neuroesteroides no afectaron el área nuclear de células gliales en el NMNF axotomizado, mecanismos importantes de discutir; si la ausencia de efectos se debió posiblemente por no alcanzarse concentraciones apropiadas en el NMNF (vía retrógrada) ó la falta del reconocimiento por parte del receptor. Es importante mencionar que PROG y DHP se unen a receptores RP, mientras que THP no lo reconoce; en forma similar, DHT y T se unen a receptores andrógenos (Melcangi y col., 1996; Friess, 2000; Engel, 2001).

CONCLUSIONES

1. Se demostró la utilidad del biomaterial quitosana como vehículo de liberación de neuroesteroides en la regeneración del nervio facial en conejos.
2. Con las prótesis de quitosana de 13 mm de longitud, se regeneró un defecto nervioso de 10 mm en la rama bucal superior del nervio facial.
3. Los nervios que fueron tubulizados con prótesis de quitosana conteniendo neuroesteroides, tuvieron mejor respuesta regenerativa; sin embargo, los mejores efectos se obtuvieron en los crecimientos nerviosos tratados con PROG; ellos, tuvieron un patrón regenerativo semejante al nervio normal a los 45 días post-axotomía. En cambio, los crecimientos nerviosos que no recibieron neuroesteroides (VEH), produjeron un patrón regenerativo indicativo de inmadurez.
4. Los efectos obtenidos de los neuroesteroides PREG ó DHA fueron menos favorables que PROG, posiblemente sus efectos neuro-activos se deban a otros metabolitos derivados de su metabolismo, a través de receptores ionotrópicos ó GABA_A.
5. No se presentaron cambios morfológicos significativos por la administración de neuroesteroides en neuronas y células gliales del NMNF a los 15 y 45 días de la axotomía. Sin embargo, todos los grupos estudiados, expresaron los cambios morfológicos (integridad citoesquelética) temporales, que tradicionalmente suceden en respuesta a lesión.

PERSPECTIVAS

1. Es necesario realizar otros estudios encaminados a conocer la respuesta inmune del receptor, efectos a largo plazo por la presencia y degradación de la prótesis, así como la utilización de éstas prótesis en la reparación de defectos mayores de 10 mm, en otras especies animales, que tengan un sistema inmunológico más parecido al de seres humanos como es el caso de los ratones transgénicos.
2. Se propone el uso de prótesis de quitosana con neuroesteroides como una alternativa terapéutica del injerto nervioso; con ello, se puede reducir el número de suturas en el sitio de implantación y evitar secundariamente la posibilidad de un neuroma y la disfunción resultante.

BIBLIOGRAFÍA

- Aebischer P, Guenard V, Winn SR, Valentini RF, Galletti PM. Blind ended semipermeable guidance channels support peripheral nerve regeneration in the absence of a distal nerve stump. *Brain Res* 1988;454:179-187.
- Allan GG. Biomedical applications of chitin and chitosan. In: Chitin, Chitosan, and related enzymes. Ed. Academic Press, Inc. Montreal.1984;119.
- Alonso DF, Gómez DE. Los mediadores de la respuesta angiogénica. *Nature* 1997;386:671-674.
- Akbuga J, Bergisadi N. 5-Fluorouracil-loaded chitosan microspheres: preparation and release characteristics. *J Microencapsul* 1996;13:161.
- Amilo S, Yañez R, Barrios R. Nerve regeneration in different types of grafts: experimental study in rabbits. *Mircrosurg* 1995;16:621-630.
- Anderson JM. Inflammatory response to implants. *ASAIO Trans* 1988;11:101-107.
- Angelova N, Hunkeler D. Rationalizing the design of polymeric biomaterials. *Trends Biotechnol* 1999;17:409-421.
- Bailey SB, Eichler ME, Villadiego A, Rich KM. The influence of fibronectin and laminin during Schwann cell migration and peripheral nerve regeneration through silicon chambers. *J Neurocytol* 1993;22:176-184.
- Banati RB, Gehrman J, Schubert P, Kreutzberg GW. Cytotoxicity of microglia. *Glia* 1993;7:111-118.
- Bates DJ, Ranford JA, Mangelsdorf DC. Blot and culture analysis of neuronotrophic factors in nerve regeneration chamber fluids. *Neurochem Res* 1991;16:621-628.
- Baulieu E, Schumacher M. Progesterone as a neuroactive neurosteroid, with special reference to the effect of progesterone on myelination. *Steroid* 2000;65:605-12.
- Baulieu EE, Schumacher M. Neurosteroids, with special reference to the effect of progesterone on myelination in peripheral nerves. *Mult Scler* 1997;3:105-112.
- Baulieu EE, Schumacher M, Koenig H, Jung-Testas I, Akwa Y. Progesterone as a Neurosteroid: Actions within the Nervous System. *Cell Mol Neurobiol* 1996;16:143-153.
- Baulieu EE, Robel P. Non-genomic mechanisms of action of steroid hormones. In: Bock GR, Goode JA, (ed) Non-reproductive actions of sex steroids. Ciba Foundation Symposium 191. Chichster: John Wiley Sons. 1995; pp 24-42.
- Baulieu EE, Robel P. Neurosteroids: A new Brain Function?. *J Steroid Biochem Molec Biol* 1990;37:395-403.
- Bayomi MA, al Suwayeh SA; el Helw AM; Mesnad AF. Preparation of casein-chitosan microspheres containing diltiazem hydrochloride by an aqueous coacervation technique. *Pharm Acta Helv* 1998;73:187.
- Berscht PC, Nies B, Liebéndörfer A, Kreuter J. Incorporation of basic fibroblast growth factor into methylpyrrolidone chitosan fleeces and determination of the *in vitro* release characteristics. *Biomaterials* 1994;15:593-600.
- Bloom J, Fawcett S. Tratado de Histología. Ed. 12va. Editorial Interamericana. Press Madrid, España. 1996. pp.55-72
- Bourre JM, Dumont O, Durand G. Brain phospholipids as a dietary source of (n-3) polyunsaturated fatty acids for nervous tissue in the rat. *J Neurochem* 1993;60:2018-2028.

Bovolenta P, Wandosell F, Nieto-Sampedro M. CNS glial scar tissue: a source of molecules which inhibit central neurite outgrowth. *Prog Brain Res* 1992;94:367-379.

Boya J, Carbonell AL, Calvo J, Borregón A. Ultrastructural study on the origin of rat microglia cells. *Act Anat* 1987;10:329-335.

Boya J, Calvo J, Carbonell AL, Borregón A. A lectin histochemistry study on the development of rat microglial cells. *J Anat* 1991;175:229-236.

Bruck W. The role of macrophages in Wallerian degeneration. *Brain Pathol* 1997;7:741-752.

Butini M, Appel K, Sauter A, Gebicke-Haerter PJ, Boddeke HW. Expression of tumor necrosis factor alpha after focal cerebral ischaemia in the rat. *Neurosci* 1996;71:1-16.

Campbell JB, Bassett Ca, Husby J, Thulin CA, Feringa ER. Microfilter sheaths in peripheral nerve surgery. *J Trauma* 1961;11:139-157.

Campbell G, Lieberman AR, Anderson PN, Turmaine M. Regeneration of adult rat CNS axons into peripheral nerve autograft: ultrastructural studies of the early stages of axonal sprouting and regenerative axonal growth. *J Neurocytol* 1992;21:755-787.

Coetze T, Suzuki K, Popko B. New perspectives on the function of myelin galactolipids. *Trends Neurosci* 1998;21:126-130.

Cohen R, Pfaff DW. Ultrastructure of neurons in the ventromedial nucleus or the hypothalamus in ovariectomized rats with or without estrogen treatment. *Cell Tissue Res* 1981;217:451-470.

Chandross KJ. Nerve injury and inflammatory cytokines modulate junctions in the peripheral nervous system. *Glia* 1998;24:21-31.

Chandy T, Sharma CP. Chitosan as a biomaterial. *Biomater Artif Cells Artif Organs* 1990;18:1-24.

Chaudhry V, Glass JD, Friffin JW. Wallerian degeneration in peripheral nerve disease. In *Neurologic Clinics. Peripheral Neuropathy: New concepts and treatments*. Baltimore Maryland. 1992;10:613-627.

Chen ZW, Wang MS. Effects of nerve growth factor on crushed sciatic nerve regeneration in rats. *Microsurgery* 1995;16:547-551.

del Cerro S, García-Estrada J, García-Segura LM. Neuroactive steroids regulate astroglia morphology in hippocampal cultures from adult rats. *Glia* 1995;14:65-71.

den Dunnen WFA, Van Der Lei B, Schakenraad JM, Blaauw EH, Stokroos I, Pennings AJ, et al. Long-term evaluation of nerve regeneration in a biodegradable nerve guide. *Microsurg* 1993;14:508-515.

den Dunnen WFA, Stokroos I, Blaauw EH, Holwerda A, Pennings AJ, Robinson PH, et al. Light-microscopic and electron-microscopic evaluation of short-term nerve regeneration using a biodegradable poly(DL-lactide-ε-caprolacton) nerve guide. *J Biomed Mater Res* 1996;31:105-115.

den Dunnen WF, Meek MF, Grijpma DW, Robinson PH, Schakenraad JM. In vivo and in vitro degradation of poly[(50)/(59)((85)/(15)(L)/(D))LA/epsilon-CL], and the implications for the use in nerve reconstruction. *J Biomed Mater Res* 2000;51:575-585.

DeFelipe J, Jones EG. *Cajal's degeneration and regeneration of the nervous system*. Published by Oxford University Press, 1991. 1st edition Printed in the United States of America. pp. 141-166, 223-264, 305-396.

Désarnaud F, Thi AN, Brown AM, Lemke G, Suter U, Baulieu EE, et al. Progesterone stimulate the activity of the promoters of peripheral myelin protein-22 and protein zero genes in Schwann Cells. *J Neurochem* 1998;71:1765-1768.

Dezawa M. Role of Schwann cells in retinal ganglion cell axon regeneration. *Progress in retinal and eye Research* 2000;19:171-204.

Dezawa M, Mutoh T, Dezawa A, Adachi-Usami E. Glial cells in degenerating and regenerating optic nerve of the adult rat. *Brain Res Bull* 1999;48:573-579.

Dezawa M, Kawana T, Dezawa A, Adachi-Usami E. The role of Schwann cells during retinal ganglion cell regeneration induced by peripheral nerve transplantation. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1997;38:1401-1410.

Di Michele, Lekieffre D, Pasini A, Bernardi G, Benavides J, Romeo E. Increased neurosteroids synthesis after brain and spinal cord injury in rats. *Neurosci Lett* 2000;284:65-68.

Dumitru D. Reaction of the peripheral nervous system to injury. In *Electrodiagnostic Medicine*. Ed Hanley-Belfus, Inc., Philadelphia. 1994. pag. 341.

Eddleston M, Mucke L. Molecular profile of reactive astrocytes implications for their role in neurologic disease. *Neuroscience* 1993;54:15-36.

Engel SR, Purdy RH, Grant KA. Characterization of discriminative stimulus effects of the neuroactive steroid pregnanolone. *J Pharmacol Exp Ther* 2001; 29:489-95.

Evans GR, Brandt K, Widmer MS, Lu L, Meszlenyin RK, Gupta PK, et al. *In vivo* evaluation of poly(L-lactic acid) porous conduits for peripheral nerve regeneration. *Biomaterials* 1999;20:1109-1115.

Fan X, Gelman BB. Schwann cell nerve growth factor receptor expression during initiation of remyelination. *J Neurosci Res* 1992;31:58-67.

Fawcett JW, Asher R. The glial scar and central nervous system repair. *Brain Res Bull* 1999;49:377-391.

Felt O, Buri P, Gurny R. Chitosan unique polysaccharide for drug delivery. *Drug Dev Ind Pharm* 1998;24:979-993.

Fields RD, LeBeau JM, Longo FM, Ellisman MH. Nerve regeneration through artificial tubular implants. *Progr Neurobiol* 1989;33:87-134.

Friess E, Schiffelholz T, Stckler T, Steiger A. Dehydroepiandrosterone –a neurosteroid. *Eur J Clin Invest* 2000; 30:46-50.

Gabrielson GJ, Stenstrom SJ. A contribution to peripheral nerve suture technique. *Plast Reconstr Surg* 1996;38:68-72.

Ganter S, Northoff H, Mannel D, Gebicke-Harter PJ. Growth control cultured microglia. *J Neurosci Res* 1992;33:218-230.

Ganong WF. Tejido excitable: Nervio. In: *Fisiología médica*. Ed: Manual Moderno S.A. de C.V. México D.F. – Santafé de Bogotá, 16^{va} edición. 1997. pag. 57-73.

Garbay B, Heape AM, Sargueil F, Cassagne C. Myelin synthesis in the peripheral nervous system. *Prog in Neurobiol* 2000; 61:267-304.

García-Estrada J, del Río JA, Luquín S, Soriano E, García-Segura LM. Gonadal hormones down-regulate reactive gliosis and astrocyte proliferation after a penetrating brain injury. *Brain Res* 1993;628:271-278.

García-Estrada J, Luquín S, Fernández AM, García-Segura LM. Dehydroepiandrosterone, pregnenolone and sex steroids down-regulate reactive astroglia in the male rat brain after a penetrating brain injury. *Int J Devl Neuroscience* 1998;16:1-7.

García-Segura LM, Lafarga M, Berciano MT, Hernández P, Andres MA. Distribution of nuclear pores and chromatin organization in neurons and glial cells of the rat cerebellar cortex. *J Comp Neurol* 1990;290:440-450.

García-Segura LM, Chowen JA, Dueñas M, Parducz A, Naftolin F. Gonadal steroids and astroglial plasticity. *Cell Mol Neurobiol* 1996; 16: 225-237.

García-Segura LM, Luquín S, Párducz A, Naftolín F. Gonadal hormone regulation of glial fibrillary acidic protein immunoreactivity and glial ultrastructure in the rat neuroendocrine hypothalamus. *Glia* 1994;10:59-69.

Genta I, Peruginini P, Pavanetto F. Different molecular weight chitosan microspheres: influence on drug loading and drug release. *Drug Dev Ind Pharm* 1998;24:779.

Gibson JD. The origin of the neural macrophage: a quantitative ultrastructural study of cell population changes during Wallerian degeneration. *J Anat* 1979;129:1-19.

Gilchrist T, Glasby MA, Healy DM, Kelly G, Lenihan DV, McDowall KL, et al. *In vitro* nerve repair – *in vivo*. The reconstruction of peripheral nerves by entubulation with biodegradable glass tubes – a preliminary report. *Br J Plast Surg* 1998;51:231-237.

Graeber MB, López-Redondo F, Ikoma E, Ishikawa M, Imai Y, Nakajima K, Kreutzberg GW, Kohsaka S. The microglia/macrophage response in the neonatal rat facial nucleus following axotomy. *Brain Res* 1998;813:241-253.

Graeber MB, Kreutzberg GW. Astrocytic reactions accompanying motor neuron regeneration. In *Adv Neur Regen Res* (ed) Seil J. Wiley-Liss, New York. 1990. pp 215-224.

Graeber MB, Kreutzberg GW. Delayed astrocytes reaction following facial nerve axotomy. *J Neurocytol* 1988;17:209-220.

Grant GA, Goodkin R, Kliot M. Evaluation and surgical management of peripheral nerve problems. *Neurosurgery* 1999;44:825-840.

Guennoun R, Schumacher M, Robert F, Desespierre B, Gouézou M, Eychemé B, Akwa Y, Robel P, Baulieu EE. Neurosteroids: Expression of functional 3β -Hydroxysteroid dehydrogenase by rat sensory neurons and Schwann Cells. *Eur J Neurosci* 1997;9:2236-2247.

Gudiño-Cabrera G, Pastor AM, de la Cruz RR, Delgado-García JM, Nieto-Sampedro M. Limits to the capacity of transplants of olfactory glia to promote axonal regrowth in the CNS. *Neuroreport* 2000;11:467-71.

Guillian D. Microglia, cytokinas and cytotoxins: modulators of cellular responses after injury to the central nervous system. *J Immunol Immunopharmacol* 1990;10:15-21.

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

Hadlock T, Sundback C, Koka R, Hunter D, Cheney M, Vacanti JP. A novel, biodegradable polymer conduit delivers neurotrophins and promotes nerve regeneration. *Laryngoscope* 1999;109:1412-1416.

Hadlock T, Elisseff J, Langer R, Vacanti JP, Cheney M. A tissue-engineered conduit for peripheral nerve repair. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 1998;124:1081-1086.

Haipeng G, Yinghui Z, Jianchun L, Yandao G, Nanming Z, Xiufang Z. Studies on nerve cell affinity of chitosan-derived materials. *J Biomed Mater Res* 2000;52:285-295.

Hall S. Axonal regeneration through acellular muscle grafts. *J Anat* 1997;190:57-71.

Hubbell JA. Bioactive biomaterials. *Curr Opin Biotechnol* 1999;10:123-129.

Jameela SR, Jayakrishnan A. Glutaraldehyde cross-linked chitosan microspheres as a long 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.

Jameela SR, Kumary TV, Lal AV, Jayakrishnan A. Progesterone-loaded chitosan microspheres: a long acting biodegradable controlled delivery system. *J Control Rel* 1998;52:17-24.

Jimeno D, Velasco A, Lillo C, Lara J, Aijón J. Response of microglial cells after a cryolesion in the peripheral proliferative retina of tench. *Brain Res* 1999;816:175-189.

Jones K, Lavelle A. Differential effects of axotomy on immature and mature hamster facial neurons: a time course study of initial nucleolar and nuclear changes. *J Neurocytol* 1986;15:197-206.

Jones K. Recovery from facial paralysis following crush injury of the facial nerve in hamsters: differential effects of gender and androgen exposure. *Exp Neurol* 1993;121:133-138.

Jones K, Kinderman NB, Oblinger MM. Alterations in glial fibrillary acidic protein (GFAP) mRNA levels in the hamster facial motor nucleus: effects of axotomy and testosterone. *Neurochem Res* 1997;22:1359-1366.

Jones K, Coers S, Storer P, Tanzer L, Kinderman N. Androgenic regulation of the central glia response following nerve damage. *Androgens and Neuronal Regeneration* 1999; 40: 560-573.

Jung-Testas I, Schumacher M, Robel P, Baulieu EE. Demonstration of progesterone receptors in rat Schwann cells. *J Steroid Biochem Mol Biol* 1996;58:77-82.

Jung-Testas I, Schumacher M, Robel P, Baulieu EE. Actions of steroid hormones and growth factors on glial cells of the central and peripheral nervous system. *J Steroid Biochem Mol Biol* 1994;48:145-154.

Kable W. Leonhardt H, Platzer W. Sistema nervioso y órganos de los sentidos. En Atlas de Anatomía. Ed Omega Plató Barcelona. 1988. pag. 34.

Kanje M, Lundborg G, Edström A. A new method for studies of the effects of locally applied drugs on peripheral nerve regeneration *in vivo*. *Brain Res* 1988;439:116-121.

Kas HS. Chitosan: properties, preparations and application to microparticulate systems *J Microencap* 1997;14:689-711

Kiefer R, Lindholm D, Kreutzber GW. Interleukin-6 and transforming growth factor-beta 1 mRNAs are induced in rat facial nucleus following motoneuron axotomy. *Eur J Neurosci* 1993;5:775-781.

Kinderman NB, Jones K. Testosterone enhancement of the nerve cell body response to injury: evidence using *in situ* hybridization and ribosomal DNA probes. *J Neurosci* 1993;13:1523-1532.

Kinderman NBV, Jones K. Axotomy-induced changes in ribosomal RNA levels in female hamster facial motoneurons: differential effects of gender and androgen exposure. *Exp Neurol* 1994;126:144-148.

Kirsch M, Schneider T, Lee MY, Hofmann HD. Lesion-induced changes in the expression of ciliary neurotrophic factor and its receptor in rat optic nerve. *Glia* 1998;23:239-248.

Koenig H, Gong WH, Pelissier P. Role of progesterone in peripheral nerve repair. *Rev Reprod* 2000;5:189-99.

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

Kreutzberg GW. Reaction of neuronal cell body to axonal damage, in *The Axon* (Waxman S., Kocsis J, Stys P. eds) Oxford University Press, New York. 1995, pp 355-374.

Kreutzberg GW. Microglia: a sensor for pathologic events in the CNS. *Trends Neurosci* 1996;19:312-318.

Kristjan R, Mirsky J, Mirsky R. Schwann cells and their precursors emerge as major regulators of nerve development. *Trend Neurosci* 1999;22:402-410.

Kujawa K, Kinderman NB, Jones K. Testosterone-induced acceleration of recovery from facial paralysis following crush axotomy of the facial nerve in male hamsters. *Exp Neurol* 1989;105:80-85.

Langone F, Lora S, Veronese FM, Caliceti P, Parnigotto PP, Valenti F, et al. Peripheral nerve repair using a poly(organo)phosphazene tubular prosthesis. *Biomaterials* 1995;16:347-353.

Lawson GM, Glasby A. Peripheral nerve reconstruction using freeze-thawed muscle grafts: a comparison with group fascicular nerve grafts in a large animal model. *JR Coll Surg Edinb* 1998;43:295-302.

Le Roux PD, Reh TA. Reactive astroglia support primary dendritic but not axonal outgrowth from mouse cortical neurons in vitro. *Exp Neurol* 1996;137:49-65.

Legent F, Fleury P, Narcy P, Beauvillain C. Complicaciones otológicas de los traumatismos craneales y fracturas del peñasco. In: Manual práctico de ORL. Ed. Masson editores, México, Impreso en México. 1985. pag. 104-108.

López-Mato A, Boullosa O, Illa G, Vieitez A. Dehidroepiandrosterona. Aspectos psico-neuro-inmuno-endocrinológicos. *Alcmeon* 1999;8:15-26.

Lorenzo-Lamosa ML, Remuñán-López JL, Vila-Jato MJ. Design of microencapsulated chitosan microspheres for colonic drug delivery. *J Control Rel* 1998;52:109-118.

Lundborg G, Bongo FM, Varon S. Nerve regeneration model and trophic factors *in vivo*. *Brain Res* 1982;232:157-161.

Lundborg G, Rosen B, Abrahamson SO, Dahlin L, Danielsen N. Tubular repair of the median nerve in the human forearm. *J Hand Surg* 1994;19:273-276.

Lundborg G. A 25-year perspective of peripheral nerve surgery: evolving neuroscientific concepts and clinical significance. *J Hand Surg [Am]* 2000;25:391-414.

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

Mc Loon LK, Lavelle A. Long term effects of regeneration on nucleolar morphology after facial nerve injury during development. *Exp Neurol* 1981;73:762-74.

Melcangi RC, Magnaghi V, Martín L. Aging in peripheral nerves: regulation of myelin protein genes by steroid hormones. *Prog Neurobiol* 2000;60:291-308.

Melgacangi RC, Magnaghi V, Cavaretta L, Martini L, Piva F. Age-induced decrease of glycoprotein PO and myelin basic protein gene expression in the rat sciatic nerve. Repair by steroid derivatives. *Neurosci* 1998;23:569-578.

Melgacani RC, Riva MA, Fumagalli F, Magnaghi V, Racagni G, Martín L. Effect of progesterone, testosterone and their 5 α -reduced metabolites on GFAP gene expresión in type I astrocytes. *Brain Res* 1996;711:10-15.

Min-Sheng W, Zhong-Wei CH, Guang-Jian Z. Topical GM1 ganglioside to promote crushed rat sciatic nerve regeneration. *Microsurg* 1995;16:542-546.

Mitsui Y, Schmelzer JD, Zollman PJ, Mitsui M, Tritschler HJ, Low PA. Alpha-lipoic acid provides neuroprotection from ischemia-reperfusion injury of peripheral nerve. *J Neurol Sci* 1999;163:11-16.

Montero OA Jr, Airoidi C. Some Thermodynamic Data on copper-Chitin and Copper -Chitosan Biopolymer Interactions. *J Colloid Interface Sci* 1999;212:212.

Morin-Richaud C, Feldblum S, Privat A. Astrocytes and oligodendrocytes reactions after a total section of the rat spinal cord. *Brain Res* 1998;783:85-101.

Morfin R, Young J, Corpéchet C, Egestad B, Sjövall J, Baulieu EE. Neurosteroids: Pregnenolone in human sciatic nerves. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992;89:6790-6793.

Moore S, Thanos S. The concept of microglia in relation to central nervous system disease and regeneration. *Prog Neurobiol* 1996;48:441-460.

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

Muzzarelli RA. Human enzymatic activities related to the therapeutic administration of chitin derivatives. *Cell Mol Life Sci* 1997;53:131-140.

Nakajima K, Reddington M, Kohsaka S, Kreutzberg GW. Induction of Urokinase-type plasminogen activator in rat facial nucleus by axotomy of the facial nerve. *J Neurochem* 1996;66:2500-2505.

Omlin FX, Webster H, Palkovits CG, Cohen SR. Immunocytochemical localization of basic protein in major dense line regions of central and peripheral myelin. *J Cell Biol* 1982;95:242-248.

Palay SL, Billings-Gagliardi SM, Chan-Palay V. Neuronal perikarya with dispersed, single ribosomes in the visual cortex of *Macaca mulatta*. *J Cell Biol* 1974;63:1074-1089.

Paparella-Shumrick. Neuroanatomía para otorrinolaringólogos. En: Otorrinolaringología (1). Ed. Médica Panamericana. Impres: Argentina, 1982; pp. 147-150.

Peluso G, Petillo O, Ranieri M, Santiin M, Ambrosio L, Calabro D, Avallone B. Chitosan mediated stimulation of macrophage function. *Biomaterials* 1994;15:1215-1220.

Peters Alan, Palay Sanford, Webster Henry. The fine Structure of the Nervous System. Neurons and their supporting cells. Third edition. New York Oxford, Oxford University Press, 1991. Printed in the United States of America. En The neuronal cell body pp 14-59; The axon pp 101-137; The cellular sheaths 212-261. The neuroglial cells pp 273-308.

Prewitt CM, Niesman IR, Kane CJ, Houle JD. Activated macrophage/microglial cells can promote the regeneration of sensory axons into the injured spinal cord. *Exp Neurol* 1997;148:433-443.

Ramírez-Exposito MJ, Martínez-Martos JM. Modificaciones morfológicas y funcionales de la microglia en respuesta a procesos neurodegenerativos en el sistema nervioso central. *Arch Neurocienc* 1999;4:21-34.

Ramón y Cajal S. Experiments dealing with the transplantation of nerves or their products, designed to prove specially an attractive or neurotrophic action on nerve sprouts. In: Degeneration and regeneration of the nervous system. (ed) May R. New York: Hafner Press. 1928. p 329-61.

Regueiro JR, López Larrea C. Inmunología. Biología y Patología del Sistema Inmune (2ª Ed). Madrid, Editorial Médica Panamericana, 1997. pp. 12-35.

Remes A, Williams DF. Immune response in biocompatibility. *Biomaterials* 1992;13:731-742.

Ridet JL, Malhotra SK, Privat A, Gage FH. Reactive astrocytes: cellular and molecular cues to biological function. *Trends Neurosci* 1997;20:570-577.

Robel P, Young J, Corpéchet C, Mayo W, Perché F, Haug M, Simon H, Baulieu EE. Biosynthesis and assay of neurosteroids in rats and mice: Functional correlates. *J Steroid Biochem Molec Biol* 1995a;53:355-360.

Robel P, Baulieu EE. Neurosteroids. Biosintesis and function. *Critical Reviews in Neurobiology* 1995b;9:382-394.

Roof RL, Duvdevani R, Heyburn JW, Stein DG. Progesterone rapidly decreases brain edema: Treatment delayed up to 20 hours is still effective. *Exp Neurol* 1996;138:246-251.

Schiefer J, Kampe K, Dodt HU, Zieglgansberger W, Kreutzberg GW. Microglial motility in the rat facial nucleus following peripheral axotomy. *J Neurocytol* 1999;28:439-53.

Schlesinger PH, Rodman JS, Doebber TW, Stahl PD, Lee YC, Stowell CP. The role of extra-hepatic tissues in the receptor-mediated plasma clearance of glycoproteins terminated by mannose or N-acetyl-glucosamine. *Biochem J* 1980;192:597-606.

Schumacher M, Robert F, Baulieu EE. Neurosteroids: trophic effects in the nervous system. *J Soc Biol* 1999;193:285-292.

Segura Egea JJ, Rubio-Manzanarez A. Los macrófagos peritoneales de rata como modelo celular *in vitro* para el estudio de la Biocompatibilidad de los materiales odontológicos. *Oper Dent Endond* 1998;2:2-8.

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

Sjöberg J, Kanje M. Insulin-like growth factor (IGF-1) as a stimulator of regeneration in the freeze injured rat sciatic nerve. *Brain Res* 1989;485:102-108.

Smith JW. Microsurgery of peripheral nerves. *Plast Reconstr Surg* 1964;33:317-329.

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

Spector JG, Lee P, Derby A, Roufa D. Early stages of facial nerve regeneration through silicone chambers in the rabbit. *Laryngoscope* 1991b;101:1109-1123.

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

Spector JG, Lee P, Derby A, Frierdich GE, Neises G, Roufa D. Rabbit facial nerve regeneration in NGF-containing silastic tubes. *Laryngoscope* 1993;103:548-558.

Steindler DA. Glial boundaries in the developing nervous system. *Annu Rev Neuosci* 1993;16:445-470.

Steuer H, Fadale R, Müller E, Müller HW, Planck H, Schlosshauer B. Biohybride nerve guide for regeneration:degradable polylactide fibers coated with rat Schwann cells. *Neurosci Lett* 1999;277:165-168.

Streit WJ, Kreutzberg GW. Response of endogenous glial cells to motor neuron degeneration induced by toxic ricin. *J Com Neurol* 1988;268:248-263.

Streit WJ, Walter SA, Pennell NA. Reactive Microgliosis. *Progress Neurobiol* 1999;57:563-581.

Strauch B. Use of Nerve conduits in peripheral nerve repair. *Hand Clin* 2000;16:123-130.

Stoll G, Jander S, The role of microglia and macrophages in the patophysiology of the CNS. *Prog Neurobiol* 1999; 58:233-247.

Stoll G, Jander S, Schroeter M. Inflammation and glial responses in ischemic brain lesions. *Prog Neurobiol* 1998;56:149-171.

Suter U, Snipes GJ, Schoener-Scott R, Welcheer AA, Pareek S, Lupski JR. Regulation of alternative peripheral myelin protein-22 gene transcript by two promoters. *J Biol Chem* 1994;269:25795-25808.

Suzuki Y, Tanihara M, Ohnishi K, Suzuki Y, 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 K, 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.

Svensson M, Eriksson P, Persson JKE, Molander C, Arvidsson J, Aldskogius H. The response of central glia to peripheral nerve injury. *Brain Res Bull* 1993;30:499-506.

Svenningsen AE, Kanje M. Estrogen and progesterone stimulate Schwann Cell proliferation in a sex- and age-dependent manner. *J Neurosci Res* 1999;57:124-130.

Tabata Y. The importance of drug delivery systems in tissue engineering. *Pharm Sci Tech T* 2000;3:80-89.

Terris DJ, Fee WE. Current issues in nerve repair. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 1993;119:725-731.

Terzis JK, Smith KL: composition of the peripheral nerve, in *The peripheral nerve: structure, Function and Reconstruction*. New York, Raven Press, 1990, pp 1-37.

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

Tsai GJ, Su WH. Antibacterial activity of shrimp chitosan against *Escherichia coli*. *J Food Prot* 1999;62:239.

Varon S, Hagg Theo. Models to evaluate effects of neurotrophic factors on axonal regeneration: Neurotrophic factors In: *Neuromethods*. Ed, A. Boulton, G. Bakeer. The Human Press Inc. 1993;25; pag. 371-407.

Verdu E, Navarro X, Gudiño-Cabrera G, Rodriguez FJ, Ceballos D, Valero A, Nieto-Sampedro M. Olfactory bulb ensheathing cells enhance peripheral nerve regeneration. *Neuroreport* 1999;10:1097-101.

Wang-Bennett Lt, Coker NJ. Analysis of axonal regeneration through the silicone regeneration chamber: a retrograde tracing study in the rabbit facial nerve. *Exp Neurol* 1990;107:222-229.

Webster H. The geometry of peripheral myelin sheath during their formation and growth in rat sciatic nerves. *J Cell Biol* 1971;48:348-367.

Webster H, Favilla JT. 1984. Development of peripheral nerve fibers. In: *Peripheral Neuropathy*, Vol. 1. P.J. Dyck, P.K. Thomas, E.H. Lambert, and R.P. Bunge, eds. Philadelphia, W.B. Saunders, pp.329-359.

Weinstein DE. The role of Schwann cells in neural regeneration. *Neuroscientist* 1999;5:208-216.

Williams LR. Exogenous fibrin matrix precursors stimulate the temporal progress of nerve regeneration within a silicone chamber. *Neurochem Res* 1987;12:851-860.

Wong BJJ, Mattox DE. Experimental nerve regeneration. A review. *Otolaryngol Clin North Am*. 1991;24:739-752.

Yasuhiko T. The importance of drug delivery systems in tissue engineering. *Pharm Sci Techn T* 2000;3:80-89.

Yu WHA. Survival of motoneurons following axotomy is enhanced by lactation or by progesterone treatment. *Brain Res* 1989;491:379-382.

Yu WHA. Sex difference in neuronal loss induced by axotomy in the rat brain stem motor nuclei. *Exp Neurol* 1988;102:230-235.

Yu WHA, McGinnis MY. Androgen receptor levels in cranial nuclei and tongue muscles in rats. *J Neurosci* 1986; 6:1302-1307.

Zhao Q, Dahlin LB, Kanje M, Lundborg G. The formation of a pseudo-nerve in silicone chambers in the absence of regenerating axons. *Brain Res* 1992;592:106-114.

Zorumski CF, Mennerick S, Isenberg KE, Covey DF. Potential clinical uses of neuroactive steroids. *Curr Opin Investig Drugs* 2000;1:360-9.

Zwain IH, Yen SS. Dehydroepiandrosterone: biosynthesis and metabolism in the brain. *Endocrinology* 1999;140:880-887.