

# UNIVERSIDAD DE GUADALAJARA

---

CENTRO UNIVERSITARIO DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y AGROPECUARIAS  
POSGRADO INTERINSTITUCIONAL EN CIENCIAS PECUARIAS DE LA  
DIVISIÓN DE CIENCIAS VETERINARIAS



*Regeneración del Nervio Ciático Axotomizado  
Tubulizado de Perros Mediante el Uso de Prótesis  
Bioactivas de "Quitosa" y Neuroesteroides*

## TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:  
**MAESTRO EN CIENCIAS**  
PRESENTA

**M.V.Z. MANUEL ROSALES CORTÉS**

DIRECTOR DE TESIS:

**DR. EN C. JACINTO BAÑUELOS PINEDA**

ASESORES DE TESIS:

**DR. EN C. JOAQUÍN GARCÍA ESTRADA**

**DRA. EN C. MA. SONIA LUQUÍN DE ANDA**

LAS AGUJAS, NEXTIPAC, ZAPOPAN JALISCO FEBRERO DE 1999

# Universidad de Guadalajara

## Centro Universitario de Ciencias Biológicas y Agropecuarias

### Posgrado Interinstitucional en Ciencias Pecuarias de la División de Ciencias Veterinarias



#### REGENERACION DEL NERVIO CIATICO AXOTOMIZADO TUBULIZADO DE PERROS MEDIANTE EL USO DE PROTESIS BIOACTIVAS DE "QUITOSANA" Y NEUROESTEROIDES.

Tesis que presenta el **M.V.Z. Manuel Rosales Cortés** para obtener el grado de Maestro en Ciencias.

Director de Tesis: **Dr. en C Jacinto Bañuelos Pineda**. Profesor Investigador del Centro Universitario de Ciencias Biológicas y Agropecuarias.

Asesores:

**Dr. en C. Joaquín García Estrada.**

Investigador del Centro de Investigación Biomédica de Occidente del Instituto Mexicano del Seguro Social.

**Dra. en C. Ma. Sonia Luquín de Anda.**

Investigadora del Centro Universitario de Ciencias de la Salud de la Universidad de Guadalajara.

Las Agujas, Nextipac, Zapopan, Jalisco Febrero de 1999.

<b>Secciones:</b>	<b>Página</b>
<b>INDICE.</b>	
<b>ABREVIATURAS.</b>	
<b>RESUMEN.</b>	
<b>1.- INTRODUCCION.....</b>	<b>x.</b>
<b>1.1.-ANATOMIA DEL SISTEMA NERVIOSO PERIFERICO.....</b>	<b>2.</b>
<b>1.1.1.-ESTRUCTURA DEL AXON.....</b>	<b>3.</b>
<b>1.1.2.-CITOARQUITECTURA DEL NERVIOS PERIFERICO.....</b>	<b>4.</b>
<b>1.1.3.- ORGANIZACIÓN ANATOMICA DEL NERVIOS CIATICO.....</b>	<b>5.</b>
<b>1.1.4.- DELIMITACION MEDULAR DE LAS ZONAS DE DOMINIO DEL NERVIOS CIATICO.....</b>	<b>6.</b>
<b>1.2.-TECNICAS QUIRURGICAS DE REPARACION NERVIOSA.....</b>	<b>6.</b>
<b>1.3.-TIPOS DE LESIONES NERVIOSAS.....</b>	<b>8.</b>
<b>1.4.- ASTROGLIOSIS TRAS LESION NERVIOSA.....</b>	<b>8.</b>
<b>1.4.1.-CITOESQUELETO DE LOS ASTROCITOS.....</b>	<b>9.</b>
<b>1.4.2.-FUNCIONES DE LOS ASTROCITOS.....</b>	<b>9.</b>
<b>1.5.-UTILIZACION DE BIOMATERIALES EN EL AREA MEDICA.....</b>	<b>10.</b>
<b>1.6.-PROPIEDADES FISICO QUIMICAS Y BIOLOGICAS DE LA QUITOSANA.....</b>	<b>10.</b>
<b>1.7.-BIOSINTESIS DE NEUROESTEROIDES EN ELTEJIDO NERVIOSO.....</b>	<b>11.</b>
<b>2.-ANTECEDENTES.....</b>	<b>13.</b>
<b>2.1.- DEGENERACION NERVIOSA TRAS LESION.....</b>	<b>13.</b>
<b>2.1.1.-DEGENERACION WALLERIANA.....</b>	<b>13.</b>
<b>2.2.- REGENERACION DEL TEJIDO NERVIOSO.....</b>	<b>14.</b>
<b>2.2.1.-EVENTOS CELULARES DE LA REGENERACION NERVIOSA.....</b>	<b>15.</b>
<b>2.3.-TUBULIZACION DE NERVIOS SECCIONADOS.....</b>	<b>17.</b>
<b>2.3.1.-EFECTOS DE TUBULIZACION EN LA REGENERACION NERVIOSA.....</b>	<b>18.</b>
<b>2.4.-ASTROCITOS REACTIVOS.....</b>	<b>19.</b>
<b>2.5.-USO DE BIOMATERIALES Y COMPUESTOS BIOACTIVOS EN LA REPARACION NERVIOSA.....</b>	<b>20.</b>
<b>2.6.-APLICACIONES DE LA QUITOSANA.....</b>	<b>20.</b>
<b>2.7.-NEUROESTEROIDES Y REGENERACION NERVIOSA.....</b>	<b>20.</b>

<b>2.8.- UTILIZACION DE NEUROESTEROIDES PROGENITORES EN LA REGENERACION NERVIOSA.....</b>	<b>21.</b>
<b>3.- PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....</b>	<b>22.</b>
<b>4.- HIPOTESIS.....</b>	<b>23.</b>
<b>5.- OBJETIVOS GENERALES.....</b>	<b>23.</b>
<b>6.- MATERIALES Y METODOS.....</b>	<b>24.</b>
<b>6.1.- ELABORACION DE LA QUITOSANA.....</b>	<b>24.</b>
<b>6.2.- PROCEDIMIENTO QUIRURGICO DE AXOTOMIA-TUBULIZACION.....</b>	<b>25.</b>
<b>6.3.- PERFUSION INTRAVASCULAR PARA FIJACION.....</b>	<b>26.</b>
<b>6.4.- INMUNOCITOQUIMICA DEL NUCLEO MOTOR DORSAL DEL NERVIPO CIATICO PARA ANALISIS DE ASTROGLIOSIS.....</b>	<b>27.</b>
<b>6.5.- HISTOQUIMICA DEL DOMINIO MEDULAR DEL NERVIPO CIATICO PARA DETERMINAR SUPERVIVENCIA NEURONAL TRAS AXOTOMIA-TUBULIZACION...27.</b>	
<b>6.6.- INCLUSION EN RESINAS EPOXICAS DE SEGMENTOS NERVIOSOS PARA ANALISIS CON MICROSCOPIA DE LUZ.....</b>	<b>28.</b>
<b>6.7.- ANALISIS MORFOMETRICO DE TRANSFORMACION ASTROCITARIA MEDIANTE MICROSCOPIA DE LUZ.....</b>	<b>29.</b>
<b>7.- RESULTADOS.....</b>	<b>31.</b>
<b>8 .- DISCUSION.....</b>	<b>57.</b>
<b>9.- CONCLUSIONES.....</b>	<b>62.</b>
<b>10.- BIBLIOGRAFIA.....</b>	<b>63.</b>

**La vida no tiene sentido cuando no se tienen metas y objetivos que cumplir y para cumplirlos es necesario el apoyo de familiares, amigos y compañeros de trabajo y es por eso que Agradezco:**

Agradezco primero a **dios nuestro señor** por permitirme ser una persona sana, estar vivo, por tener una familia que me quiere y me respeta y por tener a mis padres y a mis hermanos conmigo en especial a mi hermana Rosina Rosales Cortés gracias.

**A mi Madre y Hermanos.**

A mi esposa **Genoveva Navarro Jiménez** que con su apoyo y optimismo me supo estimular para terminar este objetivo soportando mi genio de los mil diablos y mis desesperaciones.

A mi hija que esta por nacer a la que nombrare **Paloma** pues quiero que se sienta orgullosa de mi el día de mañana.

A mi hijo **Jorge Rosales** que tiene 7 años y que aunque nuestras vidas están separadas nunca he desamparado por el amor que le tengo y del cual quiero ser un ejemplo a superar en su vida y le ruego a dios lo cuide y guíe su camino por el bien.

A mi maestro **Jacinto Bañuelos Pineda (tata Chinto)** quien con sus bromas ingenuas y su forma muy sutil me rescato de la nada y me dio la oportunidad de superarme y formar parte de su equipo de trabajo por lo que le estaré siempre agradecido, (maestro tiene ganado el cielo junto con si hijo el Gori).

A mi maestro **Joaquín García Estrada** que con su peculiar estilo de llevar la vida con su frase celebre ( todo es parte de equilibrio) quien a demás de tener un alma de jovensuelo incansable y la fuerza de un torbellino se da tiempo para formarte con sus 15 horas diarias de trabajo.

A mis compañeros **Dra., Estela Chavés**, a los QFB. **Jorge Peregrina y Ulises Gómez**, a la Psicologa **Tania**, y a la Biologa **Carmen Gómez**.

Gracias a todos

**Atte. Manuel Rosales Cortés**

Guadalajara Jalisco Febrero de 1999.

## ABREVIATURAS

**GFPA** = Proteína ácida fibrilar glial

**NGF** = Factor de crecimiento nervioso.

**bFGF** = Factor de crecimiento de fibroblastos.

**IGF-I** = Factor de crecimiento tipo 1 semejante a insulina.

**SNC** = Sistema nervioso central.

**SNP** = sistema nervioso periférico.

**HRP** = Peroxidasa de raíz fuerte de rabano.

**L6** = Lumbar seis

**L7** = Lumbar séptima

**S1** = Sacra uno

**S2** = Sacra dos

### **Esteroides estudiados:**

**Progesterona:** (4-pregнено-3,20-diona),  $C_{21}H_{30}O_2$ .

**Pregnenolona:** (5-pregnen-3 $\beta$ -OL-20-one),  $C_{21}H_{32}O_2$ .

Este trabajo se realizó en las instalaciones del LABORATORIO DE NEUROENDOCRINOLOGIA CELULAR DEL CENTRO DE INVESTIGACIÓN BIOMEDICA DE OCCIDENTE DEL INSTITUTO MEXICANO DEL SEGURO SOCIAL Y EN EL LABORATORIO DE MORFOFISIOLOGIA Y EL AREA DE CIRUGIA EN PEQUEÑAS ESPECIES DE LA DIVISION DE CIENCIAS VETERINARIAS DEL CENTRO UNIVERSITARIO CIENCIAS BIOLOGICAS Y AGROPECUARIAS DE LA UNIVERSIDAD DE GUADALAJARA JALISCO MEXICO.

## RESUMEN.

ANTECEDENTES: Las técnicas quirúrgicas tradicionales pueden aplicarse con éxito en defectos nerviosos menores de 30 mm de longitud asimismo se ha descrito que los neuroesteroides ejercen efectos benéficos en regeneración de nervios periféricos y recientemente se han utilizado biomateriales para elaborar prótesis nerviosas, entre estos destaca la "quitosana", derivado de la quitina. Por lo anterior se decidió analizar los efectos del tratamiento "in situ" del nervio ciático axotomizado de perros con progesterona o pregnenolona, utilizando el recurso de tubulización con quitosana en un defecto de 30 mm de longitud, adicionalmente analizamos los efectos de la manipulación experimental sobre la población neuronal y reactividad astrocitaria en la zona medular de dominio del nervio ciático axotomizado-tubulizado. Para determinar si las prótesis bioactivas de quitosana y neuroesteroides facilitan la regeneración del nervio ciático axotomizado-tubulizado. Utilizando 12 perros machos adultos jóvenes <10 Kg. se formaron tres 3 grupos, un control con una (n=4) implantados con prótesis de quitosana sin esteroides, experimentales implantados con quitosana y tratados *in situ* con pregnenolona (n=4) o progesterona (n=4) embebida en sus paredes (10mg/prótesis). A los 30, 60, 90 y 120 días post-lesión se sacrificó un animal de cada grupo por perfusión intravascular, se analizó el contenido de la prótesis y se separó la médula espinal desde los segmentos lumbar 6 a sacro 2 (dominio del nervio ciático) para análisis inmunocitoquímico de gliosis reactiva, una parte de estos tejidos fueron teñidos con la técnica Nissl para estudiar supervivencia neuronal. Y observamos que las cualidades físicas de las prótesis fueron adecuadas para la tubulización nerviosa, su presencia fue bien tolerada por el organismo y desde los 60 días postimplantación sufrieron el ataque de lisozimas tisulares por lo que son biodegradables. Los implantes produjeron fibrosis capsular y aunque en ninguna de ellas se observó crecimiento nervioso, se distinguió una matriz coloidal amorfa. Las neuronas axotomizadas no se degeneraron y en los segmentos medulares L7 y S2, ipsilaterales a la lesión, se produjo la mayor inmunoreactividad astrocitaria,. Todos los animales mostraron recuperación motora de la pierna lesionada desde los primeros 20 días postlesión, el segmento nervioso distal no sufrió degeneración. Finalmente se concluyó que: 1-La prótesis de "quitosana" facilitó la recuperación motora de la pierna lesionada 2-El tratamiento "in situ" con los neuroesteroides no inhibió la gliosis reactiva a nivel medular 3-La distancia entre los segmentos nerviosos fue limitante para el crecimiento del nervio posiblemente debido a reinervación colateral.

## 1. INTRODUCCION

La regeneración nerviosa a nivel del sistema nervioso periférico implica una compleja interacción de células y sustancias que promueven el crecimiento del nervio y encaminada a restaurar las funciones motoras y sensoriales. Desde las últimas tres décadas se han mantenido sin cambios las técnicas quirúrgicas para la reparación de nervios periféricos, sin embargo, se ha estudiado el efecto de diversas sustancias que pueden aplicarse directamente en el nervio o a través de una cámara de tubulización, con el propósito de facilitar la regeneración. Estas sustancias en su mayoría poseen efectos neurotróficos, actúan como mitógenos potentes y son neuritogénicas. Entre las más conocidas están; el factor de crecimiento nervioso (NGF), factor básico de crecimiento de fibroblastos (bFGF), factor de crecimiento tipo 1 semejante a la insulina (IGF-I) y los neuroesteroides, como la pregnenolona, progesterona y dehidroepiandrosterona, que actualmente se encuentran en etapa de experimentación (Salonen y col., 1987; Ide C, 1996).

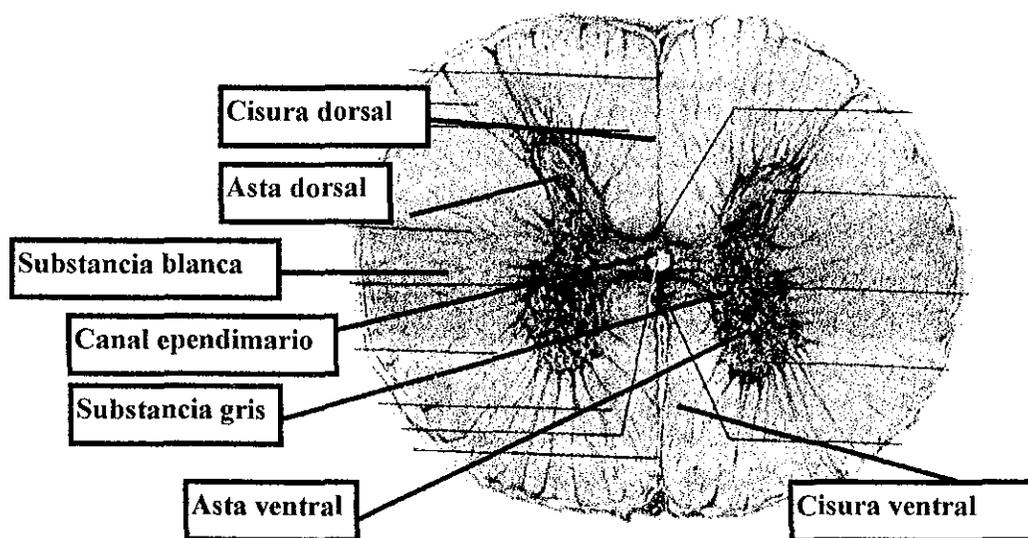
Estudios recientes sobre estos compuestos han revelado sus efectos benéficos en el tejido nervioso lesionado al aumentar la supervivencia neuronal, estimular la síntesis de mielina y disminuir el área de cicatrización tras lesión. Por sus propiedades estos compuestos podrían utilizarse para el tratamiento de diversas clases de trastornos del tejido nervioso adulto (Weiss 1994; William y col., 1987; Varón, 1993) .

Una de las principales tendencias para el futuro es la utilización de compuestos neurotróficos y biomateriales que hagan posible la aceleración de la regeneración nerviosa o la recuperación exitosa de lesiones en las que sucede pérdida de segmentos extensos de nervios como lo ha demostrado con bastantes limitaciones la silicona el millipore, el ácido poliglicólico y la quitosana que esta en etapa de experimentación en nuestro laboratorio (Medinacelli y col, 1983) .

### 1.1. ANATOMIA DEL SISTEMA NERVIOSO PERIFERICO.

La médula espinal (Figura 1), es una masa cilíndrica alargada de tejido nervioso que ocupa dos tercios superiores del conducto raquídeo, está envuelta por las vértebras, ligamentos y las meninges que contienen el líquido cefalorraquídeo, fundamentalmente se distinguen la sustancia blanca compuesta por fibras nerviosas y la sustancia gris, en la que está presente la principal población neuronal. La forma, cantidad y aspecto de la sustancia gris se modifica a través de los diferentes niveles medulares, la mayor proporción de sustancia gris respecto a sustancia blanca se encuentra en los abultamientos lumbar y cervical (López A., 1987 5ª). En la sustancia gris están presentes diversas estirpes celulares; células gliales, células preganglionares del sistema nervioso autónomo, neuronas sensitivas y motoras (Estratton, 1985 6ª).

Rodeando a la sustancia gris se encuentra la sustancia blanca, ella está compuesta de fibras nerviosas dentro de una red de neuroglia, las fibras pueden ser mielinizadas o no mielinizadas y sirven para enlazar entre sí a diferentes segmentos de la médula espinal y conectar a la médula con el encéfalo (Joseph 7ª ).



**Figura.-1.** Imagen de médula espinal, en sección transversal se ve que la médula espinal contiene una masa interna de sustancia gris, en forma de H, rodeada por sustancia blanca. La sustancia gris esta constituida por dos mitades simétricas unidas en la línea media por una conexión transversal, de sustancia gris a través de la cual corre un pequeño conducto central llamado canal endimario.

### 1.1.1 ESTRUCTURA DEL AXON

Fuera del SNC, el axón de la neurona adquiere una vaina de mielina, complejo lipoproteínico formado por varias capas de la membrana celular de las células de Schwann, estas células son similares a la glía y se encuentran a lo largo de los nervios periféricos (Koenig y col., 1995). La vaina de mielina envuelve al axón excepto en su terminación y en los nodos de Ranvier, constricciones periódicas de 1  $\mu\text{m}$  separadas entre sí por, aproximadamente, 1 mm de mielina. (Dumitru, 1994). Sin embargo, no todas las neuronas de los mamíferos son mielinizadas, algunas están amielínicas, es decir que sólo están rodeadas por células de Schwann, pero no contienen la envoltura alrededor del axón que produce la mielina. En el SNC de los mamíferos la mayor parte de las neuronas están mielinizadas, pero las células que forman mielina son oligodendrocitos en lugar de células de Schwann (Koenig y col, 1995).

Desde el punto de vista morfofuncional, las neuronas tienen cuatro zonas de importancia; a) zona receptora o dendrítica, en las que se integran los cambios locales múltiples del potencial generados por las conexiones sinápticas; b) sitio en el que se generan los potenciales de acción propagados (segmento inicial axónico); c) una prolongación al axón que transmite los impulsos propagados hasta las terminaciones nerviosas, d) las propias terminaciones nerviosas, en donde los potenciales de acción causan la liberación de los transmisores sinápticos (Ganong, 1997). **Transporte axónico:** el cuerpo celular de la neurona mantiene la integridad funcional y anatómica del axón mediante los productos sintetizados en el citoplasma neuronal y transportados hacia las terminales axónicas por un proceso de flujo axoplásmico; para ello intervienen distintos mecanismos de transporte a) *anterógrado* (del cuerpo celular hacia la periferia) con una velocidad de desplazamiento de 4 mm/día b) *retrogrado* (hacia el cuerpo celular) con 2 mm/día de desplazamiento, mediante estos mecanismos se transportan enzimas, glucoproteínas y subcomponentes membranosos por medio de filamentos, fundamentalmente neurofilamentos y microtúbulos; de esta manera se mantiene constante la comunicación química entre el soma neuronal y sus prolongaciones más distales; si el axón es seccionado, la porción distal con relación al corte, degenera.

### 1.1.2 CITOARQUITECTURA DEL NERVIIO PERIFERICO

El nervio periférico (Figura 2) se forma de fibras nerviosas agrupadas individualmente que forman fascículos de diferente tamaño y número; éstos están rodeados por tejido conectivo y así se distinguen tres estructuras: el epineurio rodea a los fascículos, y perineurio cubre la totalidad del fascículo (agrupamiento de axones) y el endoneurio envuelve cada axón (Kable, 1986; Dumitru, 1994).

Durante el desarrollo, los axones se encuentran sin mielinizar, y conforme maduran son envueltos por vainas de mielina. Los axones de mamíferos son relativamente pequeños, su diámetro es de 20  $\mu\text{m}$  o menos (Ganong, 1997), en el conejo el diámetro normal del axón mielinizado varía de 1 a 10  $\mu\text{m}$  y el espesor de la mielina es de 1.2  $\mu\text{m}$  (Chen y col., 1989; Spector y col., 1993), El diámetro de fibras nerviosas regeneradas en ratas es de 4.01 a 15.16  $\mu\text{m}$  (Chen y col., 1995), en el humano el tamaño del axón mielinizados varía de 2-14  $\mu\text{m}$  (Ochoa, 1969; Dumitru, 1994). Las fibras mielinizadas se encuentran aisladas de la membrana basal y separadas del resto de elementos nerviosos, cada axón mielinizado esta envuelto por una célula de Schwann y además contienen mitocondrias y filamentos longitudinales (Ochoa, 1969; Chaudhry y col., 1992). La densidad de las fibras mielinizadas varía entre los mismos fascículos del mismo nervio. A diferencia de las fibras mielinizadas, las no mielinizadas pueden contener, en una sola célula de Schwann, varios axones; éstos están cubiertos por bandas gruesas; algunas bandas se conectan unas con otras y se encierran en una membrana basal. En el humano, el diámetro de estas fibras varían de 0.2  $\mu\text{m}$  a 3.0  $\mu\text{m}$  (Ochoa, 1969). Duncan, en 1934, mencionó que la mielinización está en función del diámetro axonal. En el humano, el endoneurio contiene células nerviosas como células de Schwann, de origen ectodérmico y no nerviosas como fibroblastos, células endoteliales, pericitos y ocasionalmente células cebadas de origen mesodérmico (Ochoa, 1969; Spector, 1993; Dumitru, 1994); otras células exógenas que se encuentran entre las vainas de tejido conectivo del nervio periférico son fibroblastos, fibras de colágena, macrófagos y mastocitos (Kable, 1988; Varón, 1993). Generalmente, mediante microscopía de luz, no es posible diferenciar células de Schwann de fibroblastos; el núcleo de las primeras se identifica cuando se localizan cerca de fibras mielinizadas; en las no mielinizadas éstas células presentan expansiones citoplasmáticas claras, en cambio, el núcleo de los fibroblastos es irregular, la periferia es densa por cromatina y a través de microscopía electrónica es fácilmente distinguir ambas células; mediante esta última técnica, en el nervio sural del humano se observa 91.8% de células de Schwann y 8.2% de fibroblastos (Ochoa, 1969).

En general, cuanto mayor es el diámetro de una fibra nerviosa, mayor es la velocidad de conducción (Douglas, 1986). 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 más delgados se ocupan de las sensaciones dolorosas y de la temperatura, así como de las funciones autónomas (Ganong, 1997).

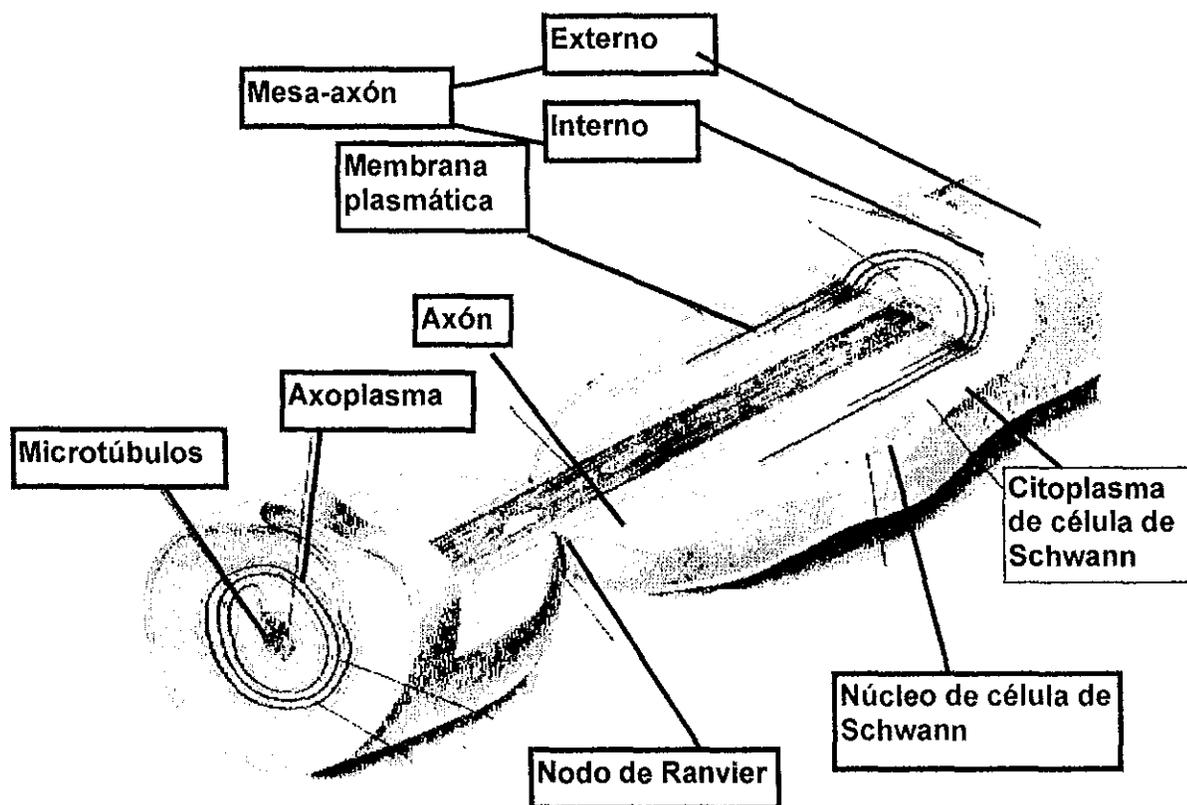
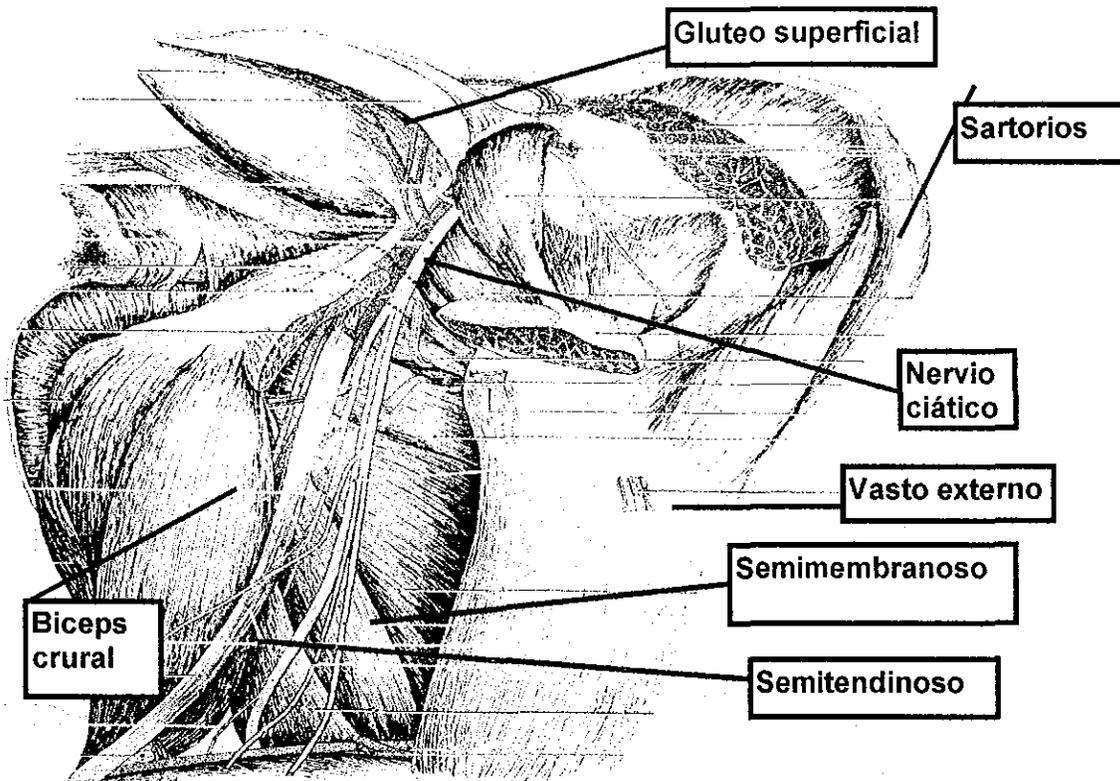


Figura 2 - Corte transversal de un nervio periférico mostrando su citoarquitectura.

### 1.1.3 ORGANIZACION ANATOMICA DEL NERVIO CIATICO.

Está formado por los nervios peroneo fibular común y tibial, al principio ellos forman un solo tronco en su recorrido por la pelvis y el muslo y están rodeados por una vaina de tejido conectivo. Atravesan la pelvis por el orificio infrapiriforme y se dirigen hacia la rodilla, pasando profundamente al músculo glúteo mayor y se colocan en posición dorsal al músculo obturador interno, cuadrado femoral y abductor mayor y proporciona inervación,

principalmente a los músculos extensores de la cara externa (Bercsches, 1994) como se observa en la figura 3 donde se han retirado algunos músculos para lograr observarlo.



**Figura 3** - Vista lateral del miembro posterior del perro donde se observa los principales músculos que están inervados por el nervio ciático.

#### **1.1.4 DELIMITACION MEDULAR DE LAS ZONAS DE DOMINIO DEL NERVI0 CIATICO.**

De los experimentos preliminares realizados mediante inyección de peroxidasa de raíz fuerte tipo VI en una zona del nervio ciático del perro, se delimitaron sus principales zonas de dominio, en donde el marcaje neuronal más intenso estuvo comprendido entre la sexta vértebra lumbar y la segunda sacra, por esta razón se centró la atención en el análisis cuantitativo de estas regiones (Budras, 1989).

#### **1.2 TECNICAS QUIRURGICAS DE REPARACION NERVIOSA.**

Desde hace 1800 años se han realizado esfuerzos para lograr la reparación de nervios seccionados y a pesar de la introducción de técnicas quirúrgicas, las lesiones de nervios periféricos continúan generando problemas clínicos, económicos y sociales (Hurtado y col., 1987; Terris y col., 1993). Fue Galeno (200, A.D) quien discutió la posibilidad de la regeneración nerviosa (Terris y col.,1993); más tarde, Paul de Argina (600, A.D) realizó la primera reparación nerviosa mediante suturas; técnica quirúrgica conocida hoy como

neurorrafía; aproximación de los segmentos nerviosos mediante sutura (Paparella, 1982).

Años después, Waller en 1850, estudió la regeneración y degeneración de nervios periféricos (Waller, 1850). Posteriormente, Seddon en 1947, introdujo los injertos nerviosos, técnica quirúrgica mediante implantación de aloinjertos y autoinjertos nerviosos debido a pérdida de segmentos nerviosos, cuya reparación no es posible mediante neurorrafía, (Seddon, 1947). Highet y Sanders propusieron técnicas de enlongación para eliminar la tensión en la reparación de nervios y posteriormente se iniciaron los injertos nerviosos vascularizados (Paparella, 1982). Con la introducción del microscopio quirúrgico, se mejoraron los procedimientos de reparación (Smith, 1964) así, Langley y Hashimoto introdujeron la reparación fascicular y perineural con sutura (Terris, 1993); aunque desde 1972, se reportó por primera vez la reparación interfascicular (Millesi y col., 1972).

Otro avance en la reparación de nervios periféricos, en sustitución al implante de aloinjertos y autoinjertos, ha sido la "*técnica de tubulización*" introducida por Weis en 1944 (Brian, 1991; Terris y col., 1993) son estructuras cilíndricas en las que se introducen los extremos de un nervio seccionado para promover su regeneración; los materiales utilizados varían desde sustancias artificiales como tubos de silicona (Spector, 1991ab, 1992, 1993), Gortex (Terris y col., 1993), millipore (Campbell y col., 1961) surgicel (Gabrielson y col., 1966), colágena (Braun y col., 1966), ácido poliglicólico (Pham y col., 1991) hasta materiales orgánicos, como duramadre, vena, y componentes de membrana basal (Brian, 1991; Terris y col., 1993). Desde hace dos años se han empezado a utilizar biomateriales como la quitosana para la reparación de nervios (Gómez, 1998).

En forma paralela, se introducen avances en el material de sutura, ordinariamente se utilizan filamentos de sutura de nylon 9-0 y 10-0 para la reparación de nervios (Edshage y col., 1964; Bratton y col., 1989; Giddens y col., 1989). Sin embargo, recientemente se han introducido nuevos procedimientos que ofrecen mayor fuerza mecánica, mejoran los resultados funcionales y requieren menor habilidad técnica; entre los métodos están el adhesivo de fibrina (Nishihira y col., 1989) y el láser (Maragh y col., 1988).

Por otra parte, las técnicas quirúrgicas y los factores mecánicos que determinan el éxito de la reparación del nervio están bien identificados, en este campo el foco de la investigación se ha desviado hacia el logro de una mejor regeneración nerviosa a través de sustancias que promuevan el crecimiento nervioso (Lawrence 1987; Müller, 1987; Sebillé, 1988; Sjöbeerg, 1989; Chen YS, 1989; Bates, 1991; Spector, 1993; Varón, 1993).

Estas sustancias han demostrado su eficacia *in vitro* y algunas *in vivo*, conocidas como factores neurotróficos y neuritogénicos endógenos; el más estudiado y conocido de

ellos es el *factor de crecimiento neural* (NGF) (Lipton, 1989; Brian, 1991) que manifiestan diversos efectos benéficos en el proceso de regeneración neuronal ( Snyder y col., 1988). Otros factores estudiados *in vitro* han sido el *factor básico de crecimiento de fibroblastos* (bFGF) (Esch y col., 1985) y el factor de crecimiento tipo 1 semejante a la insulina (IGF-1) (Sjöbeerg y col.,1989). Diversos autores han destacado la participación del sistema endocrino en la reparación neural, y se ha demostrado que sustancias como ACTH, T3, T4 y testosterona (Terris y col., 1993; Jones.,1993,1997) incrementan la regeneración nerviosa, aunque tal vez los efectos de estas hormonas sean indirectos *in vivo* (Brian, 1991).

Existen otras sustancias endógenas con propiedades similares al NGF y conocidas como "*neuroesteroides*" (Baulieu y Robel,1990,1994,1995) por su síntesis en el tejido nervioso. Actualmente se estudia la pregnenolona (Kabbadj y col.,1993), progesterona, (Testas, 1995; Koenig,1995) y dehidroepiandrosterona (Akwa y col.,1993), todas ellas han mostrado efectos benéficos en la regeneración del nervio facial y ciático en roedores (Gómez, 1998)..

### **1.3 TIPOS DE LESIONES NERVIOSAS**

La sección, compresión, aplastamiento, inyección, isquemia, congelamiento etc., son lesiones en fibras nerviosas que se clasifican en tres categorías: (Varon,1994). Neuropraxia; lesiones en la vaina de mielina y los nodos de Ranvier, que conducen a un bloqueo focal en la conducción nerviosa sin degeneración distal subsecuente (Chaudhry y col.,1992). Axonotmesis; el axón y la vaina de mielina se interrumpen, persistiendo continuidad en la lámina basal y tejido conectivo seguidos de degeneración nerviosa distal (Dumitru,1994;). Neurotmesis; sección de la fibra nerviosa, tejido conectivo y lámina basal, estas lesiones se producen después de heridas penetrantes; al interrumpirse la continuidad axonal se produce la degeneración walleriana (Chaudhry,1992; Dumitru,1994). En el presente estudio, se provoco "sección con pérdida de un segmento nervioso".

### **1.4 ASTROGLIOSIS TRAS LESION NERVIOSA.**

Tradicionalmente las células gliales se clasifican en macroglia y microglia (Ortega, 1917), la macroglia está comprendida por astrocitos protoplásmicos y fibrosos, oligodendrocitos y ependimocitos de origen ectodérmico. La microglia es muy minoritaria y proviene del mesodermo (Peters y col.,1976; Weighert, 1985). Los astrocitos fibrosos están en sustancia blanca y los protoplásmicos en sustancia gris. Los astrocitos fibrosos poseen abundantes fibrillas compuestas por filamentos intermedios constituidos por la (GFAP) proteína ácida fibrilar glial (Schachner y col.,1977). Mediante cultivos celulares se han establecidos astrocitos tipo I y II (Raff y col., 1983ab; Miller y col., 1985). Los astrocitos tipo I

solamente se encuentran en cultivos de sustancia blanca (Miller y Raff, 1984; Miller y col., 1988), posiblemente existen otras subclases de astrocitos. Cabe mencionar que la membrana plasmática de los astrocitos difiere regionalmente en los tipos de receptores, canales iónicos o sistemas de transporte activo (Fedroff, 1986).

#### **1.4.1 CITOESQUELETO DE LOS ASTROCITOS**

El citoesqueleto de las células animales controla la forma, motilidad y crecimiento celular así como diversos procesos secretores (Zor, 1983), consiste de microtúbulos, microfilamentos y filamentos intermedios (10 nm) interconectados (Zor, 1983). La principal sub-unidad de los microtúbulos es la tubulina ( $\alpha$  y  $\beta$ ) y la actina de los microfilamentos, se encuentran en astrocitos, oligodendrocitos, microglia, y células ependimales (Lazarides, 1980).

Los astrocitos expresan la proteína ácida de los filamentos en alguna fase de su desarrollo (Bignami y col., 1972), esta proteína pesa entre 48,000 a 51,000 daltons, según la especie animal. Fue aislada por primera vez a partir de placas de esclerosis múltiple (Eng y col., 1971), actualmente se usa como marcador de la línea celular de los astrocitos (Suárez y col., 1987; Bignami y col., 1972). La inmunocitoquímica se hace usando Ac generado contra GFAP, proteína relativamente resistente al efecto enmascarante de fijadores en inclusión en parafina (Dahl y Bignami, 1973). Esta es antigénicamente distinguible de las demás proteínas del citoesqueleto (Eng, 1980), existe una relación entre la maduración astrocitaria, el aumento del marcaje inmunocitoquímico para GFAP y el incremento del número de filamentos gliales (Trimmer y col., 1982). También se produce aumento en la tinción para GFAP por efecto de lesiones del SNC (Barrett y col., 1981).

#### **1.4.2 FUNCIONES DE LOS ASTROCITOS**

Son células especializadas en contactos con superficies piales, perivasculares o ventriculares, sobre las que forman expansiones terminales y los astrocitos están interconectados mediante uniones comunicantes, o uniones adherentes (Kuffler y Nicholls, 1966; Varón y Somjen, 1979), y su distribución determina la existencia de compartimentos sinápticos (Kalman y Hajos, 1989; Wilkin y col., 1990), también controlan la composición molecular y iónica del espacio extracelular (Orkand, 1989; Walz, 1989), ya que poseen canales para  $\text{Na}^+$  (Netter y col., 1983),  $\text{Cl}^-$ ,  $\text{K}^+$  (Quandt y McVicar, 1984) y  $\text{Ca}^{2+}$  en su membrana plasmática (McVicar, 1984), regulando además la composición del líquido cefalorraquídeo (Hertz, 1978).

La heterogeneidad regional astrocitocitaria permite interacciones específicas con poblaciones neuronales (Chamak y col., 1987; Wilkin y col., 1990; Palacios y col., 1979; Gilad

y col.,1988), por ejemplo existen relaciones tróficas entre astrocitos y neuronas (Bouchaud y Bosler, 1986; Stewart y Rosenberg, 1979; Berkley y Contos, 1987), que consisten en intercambios moleculares iónicos entre células gliales y neuronas.

Los astrocitos también están implicados en el recambio y metabolismo de neurotransmisores, algunos poseen sistemas de transporte activo para la captación de dopamina, noradrenalina (Pelton y col.,1981), adenosina (Kimelberg y Pelton, 1983), serotonina (Tardy y col.,1982), glicina, GABA, glutamato, aspartato y taurina (Schousboe, 1978), Los astrocitos, mediante la enzima glutamina sintetasa (Mattson y col.,1992), protegen a las neuronas de la exposición al glutamato (Norenberg, 1983), y ácidos grasos libres que se acumulan en el edema vasogénico (Kinoshita y col.,1990). Los astrocitos también pueden liberar aminoácidos neurotransmisores al espacio extracelular (Minchen y Iversen, 1974).

En su membrana plasmática poseen receptores para diversos neurotransmisores y neuropéptidos; como dopamina (Henn y col.,1977), noradrenalina (McCarthy y col.,1988), y serotonina (Fillion y col.,1977). Ellos también participan en los mecanismos de regeneración del tejido nervioso e influyen sobre la densidad sináptica (Poulain, 1984,1992).

### **1.5 LA UTILIZACION DE BIOMATERIALES EN EL AREA BIOMEDICA.**

En nuestro medio existen numerosos polímeros naturales como la celulosa, el caucho, almidón, gomas y pectinas y la "quitosana", es uno de ellos ya que es un homopolímero lineal con enlaces *beta (1-4) N-acetilglucosamina* semejante a celulosa presente en grandes cantidades en el caparazón de invertebrados marinos (Chobot, 1995) también se encuentra en el tallo de plantas y hongos.

Este biomaterial actúa como anticoagulante y antiagregario de plaquetas (Beena, 1994; Okamura, 1995) y ha sido utilizado con buenos resultados en la recuperación de lesiones cutáneas difíciles (Berscht, 1994) y como vehículo para la liberación prolongada de compuestos neurotróficos, la estimulación inmunológica por la quitosana resulta a través del óxido nítrico que induce la quimiotaxis de macrófagos *in vitro* (Peluso, 1994 ; Escott.1995), a su vez los macrófagos y neutrófilos inducen la síntesis de factores tróficos mediante un mecanismo autócrino de regulación (Usami, 1995; Marcinkiewicz, 1991).

### **1.6 PROPIEDADES FISICO-QUÍMICAS Y BIOLÓGICAS DE LA QUITOSANA.**

La *quitosana* es insoluble en agua, soluciones alcalinas y solventes orgánicos puros, es soluble en todos los ácidos orgánicos e inorgánicos (excepto el sulfúrico), al mezclarse con ellos produce  $\text{NH}_3^+$ . Su solubilidad no depende del pH, sin embargo, se empieza a precipitar con pH superior a 6.3, su viscosidad varía según la temperatura, es

completamente estable a temperatura ambiente y la humedad relativa no le afecta, por lo que no sufre putrefacción.

Puede modificarse la viscosidad y resistencia de la *quitosana* al ataque de lisozimas tisulares mediante el uso de fijadores del tipo aldehídos (formaldehído, glutaraldehído, paraformaldehído). Así mismo, durante el proceso químico preparativo, es posible lograr que adopte la forma de moldes específicos y conferirle características particulares de tenacidad y resistencia (Machida, 1993). Por otra parte, experimentos realizados en el laboratorio han demostrado que la *quitosana* se torna ligeramente electroconductiva en contacto con fluidos orgánicos, al menos a través de su superficie.

### 1.7 BOISINTESIS DE NEUROESTEROIDES EN EL TEJIDO NERVIOSO.

Mediante segmentación de las cadenas laterales del colesterol, el SN sintetiza una variedad de esteroides (Clemens y Weaver, 1985) sin relación con la esteroidogenesis extracerebral (Akwa y col.,1993 ab; Kabbadj y col.,1993). Estos esteroides endógenos fueron denominados "*neuroesteroides*" (Baulieu, 1981; Baulieu y Robel, 1990; Robel y Baulieu, 1994,1995a) y son sintetizados en neuronas y células gliales mediante la enzima P-450<sub>scc</sub> en la membrana interna mitocondrial (Baulieu y Robel, 1990; Robel y Baulieu, 1995; Robel y col.,1994,1995ab).

Los neuroesteroides tienen efectos moduladores específicos sobre receptores ionotrópicos para diferentes neurotransmisores como el GABA<sub>po</sub>, glicina y glutamato, por lo que afectan la excitabilidad neuronal, actualmente son considerados como una nueva clase de neuromoduladores (Puia y col.,1990; Baulieu, 1991; Baulieu y Robel, 1990; Robel y Baulieu, 1995b; Del Cerro y García, 1995). También regulan el crecimiento y diferenciación de astroglia *in vitro* (Jung-Testas y col., 1994; Del Cerro y García, 1995) y se ha demostrado que astrocitos y oligodendrocitos los sintetizan (Testas y col., 1989ab; Testas y col.,1994).

Los primeros neuroesteroides descubiertos fue la pregnenolona, progesterona (PROG), dehidroepiandrosterona y sus derivados sulfatados (Baulieu, 1991; Baulieu y Robel, 1990; Robel y Baulieu, 1995a; Robel y col.,1995b); ellos también pueden presentarse en forma de estereificados, se ha demostrado que las formas sulfatadas son excitatorias (Robel y col., 1995a) .

La pregnenolona es el principal precursor de la síntesis "*de novo*" de neuroesteroides en tejido nervioso(Brown y col.,1979; Robel y col.,1995a), ella origina la *progesterona* y la dehidroepiandrosterona (DHA); y la serie completa de esteroides (Robel y Baulieu, 1995b; Robel y col.,1995a). Las *células de Schwann* del SNP sintetizan *progesterona* a partir de

pregnenolona, independientemente de la edad y del sexo (Testas y col., 1995; Koenig y col., 1995).

Los efectos celulares de los neuroesteroides son rápidos y específicos (Baulieu y Robel, 1990; Robel y Baulieu, 1995b), se desconocen sus mecanismos de acción neuro-reparativos y su mecanismo de regulación (Baulieu, 1994) posiblemente actúen a través de segundos mensajeros (Baulieu, 1994). mediante receptores nucleares clásicos para hormonas o uniéndose al complejo oligomérico receptor para GABA<sub>A</sub>, modulando canales ionotrópicos membranales (Baulieu, 1994; Robel y Baulieu, 1995b). Sus mecanismos de acción pueden ser *genómicos* y *no genómicos* y a través de una regulación autocrina-paracrina entre neuronas y las células no nerviosas implicadas en la cascada de eventos que siguen a una lesión del tejido nervioso (Baulieu y Robel, 1990; Baulieu, 1994; Robel y Baulieu, 1995b).

## 2. ANTECEDENTES.

El sistema nervioso (SN) de los mamíferos consiste de neuronas astrocitos, oligodendrocitos, células de microglia, células de Schwann y fibroblastos endoneurales (Richardson y col, 1991; Berkenbosch y col, 1992). Las neuronas se especializaron en la integración y transmisión de impulsos, los astrocitos regulan el espacio extracelular, la microglia es fagocítica, como los macrófagos tisulares; y los oligodendrocitos sintetizan mielina (Orkand, 1989; Walz, 1989). En neuronas se distinguen dendritas que se extienden desde el soma y se arborizan. Del cuerpo celular también se extiende un axón, único este se divide en ramas terminales y es donde se almacenan los neurotransmisores secretados por el proceso axónico (Ganong, 1997).

### 2.1 DEGENERACION NERVIOSA TRAS LESION.

Después de la sección de un nervio, la primera degeneración anterógrada se produce en el extremo distal de las fibras nerviosas (degeneración Walleriana) (Chaudhry y col.,1992; Dumitru, 1994) luego se manifiesta el efecto en las fibras proximales a la lesión degeneración retrógrada (Chaudhry y col.,1992; Dumitru,1994); en el soma neuronal se producen cambios de severidad variable que pueden ocasionar hasta la muerte neuronal, degeneración axonal o reacción axonal (Dumitru,1994; Ganong,1997).

#### 2.1.1 DEGENERACION WALLERIANA

En 1850, Waller describió la reacción neural en respuesta a lesión, su descripción se conoce como degeneración Walleriana (Dumitru,1994), actualmente este término se aplica a los cambios fisiológicos tempranos de una secuencia nerviosa degenerativa resultante de la lesión nerviosa, (Chaudhry y col.,1992). Inicialmente sucede desintegración granular del andamiaje que forma el citoesqueleto axonal (Chaudhry y col.,1992; Dumitru, 1994); con la sección nerviosa resultan pérdida del axoplasma y desintegración de organelos con fragmentación de membranas, finalmente solo persiste una vaina de mielina con residuos del axón, todos estos cambios distales son consecuencia de interrupción del transporte axonal durante la cual se suspende el soporte trófico y nutritivo (Chaudhry y col.,1992). El mecanismo de desintegración del citoesqueleto axonal difiere entre especies (Miledi y col.,1970; Pellegrino y col.,1986; Perry y col., 1990; 1993), en roedores puede iniciar su degeneración desde las primeras 24 hrs. (Miledi y col.,1970), por lo contrario, en humanos y gatos, el axoplasma permanece intacto por 3 días (Stoll y col.,1989; Pellegrino y col.,1986), el tamaño de la fibra nerviosa, edad, temperatura, etc, son factores que influyen sobre el tiempo de desintegración axonal (Chaudhry y col.,1992; Dumitru,1994). Enseguida se afecta *la vaina de mielina* al inhibirse la síntesis de lípidos (White y col., 1989; Dumitru,1994)

y disminuye el contenido de mRNA en células de Schwann (Trapp y col., 1988), esto condiciona fragmentación de la vaina de mielina (Chaundhry y col.,1992). Al final de la tercera semana postlesión nerviosa, en roedores y gatos, ha sucumbido la mielina; con acúmulos de fragmentos de membranas que condicionan la presencia de células de Schwann y forman la llamada *banda longitudinal de Büngner*, signo favorable para la regeneración axonal (Spencer y col.,1979). Mas tarde sucede la respuesta de macrófagos, estrechamente vinculadas con la degeneración y regeneración axonal (Hann y col.,1989).

Normalmente se encuentran macrófagos residentes en nervios periféricos a lo largo de la lámina basal de vasos endoneurales; en respuesta a lesión, ellos migran hacia las fibras degeneradas para realizar funciones fagocíticas (macrófagos adherentes), se identifican desde las primeras 24 hrs y su número aumenta los primeros días postlesión (Stoll y col.,1989; Dumitru,1994;), en roedores, la depuración de *detritus* de mielina ocurre en un período de un mes y en humanos hasta 7 meses (Chaudhry y col., 1992). Los macrófagos producen citocinas como interleucina-1 (IL-1); que al parecer estimula la síntesis de NGF por células de Schwann denervadas ( Lindholm y col.,1987).

En el cuerpo celular suceden "cambios neurales retrógrados" tras lesión nerviosa; son conocidas como degeneración axonal retrógrada, la intensidad de su manifestación depende del tipo de lesión (Wang-Bennett y col.,1990), el soma neuronal puede recuperarse o degenerarse (*chromatolisis*), el cuerpo celular se edematiza y aparece convexo; el aparato de Golgi es desplazado hacia la periferia junto con el núcleo y este aparece tumefacto con excentricidad nucleolar y sin cromatina. Cuando ha sucedido disolución de cromatina no puede recuperarse (cariorrexis) (Kujawa, y col., 1989; Jones, 1993) inicialmente se produce ruptura de la membrana plasmática, expulsión del contenido citoplasmático y vacuolización (Dumitru, 1994).

## **2.2 REGENERACION DEL TEJIDO NERVIOSO**

Desde hace muchos años se propuso que "sustancias humorales ", originadas de la lesión, influían sobre la regeneración axonal del nervio periférico (Forssman, 1898,1900; Ramón y Cajal, 1928), en los últimos 30 años se ha confirmado la hipótesis de que complejos humorales, celulares y factores extracelulares están relacionados con el crecimiento axonal (Bailey y col.,1993). El paradigma experimental de colocar un tubo de silicona entre los dos segmentos de un nervio seccionado, ha permitido descubrir la secuencia de eventos durante la regeneración nerviosa (Weiss, 1944; William y col.,1987; Varón, 1993; Lundborg y col., 1994). Las primeras respuestas están encaminados a incrementar la supervivencia neuronal, intervienen factores tróficos (*NGF, NT-3, BFGF,*

*BDNF*) cuya síntesis es desencadenada por la glia (Salonen y col, 1987; Ide C, 1996); después ocurre la formación de una matriz extracelular compuesta por *laminina*, *colágena tipo IV*, *fibronectina* y *moléculas adhesivas neurales* (Spector y col.,1993). Con la matriz se promueve la enlongación de neuritas y la síntesis de mielina por células de Schwann, también intervienen fibroblastos perineurales (Lawrence, 1987; Spector y col., 1991,1992,1993; Danielsen,1996) y moléculas de adhesión *N-CAM*, *L1* y *N-cadherina*, implicadas en la unión celular axón-axón y axón-célula de Schwann (Ide C, 1996; Smith,1996), funciones igualmente importante realizan las integrinas alfa 1- beta 1 y alfa 6- beta 1 (Salonen, 1987; Ide C, 1996). Adicionalmente la proteína cinasa C y GAP-43 intervienen en la actividad del crecimiento axónico (Salonen, 1987; Ide C, 1996).

Por otra parte, la regeneración nerviosa depende del tipo de lesión; lesiones por aplastamiento tienen mayor éxito en regenerarse por preservar la continuidad en la vaina endoneural, la vasculatura y citoarquitectura en el muñón distal (Mackinnon y col., 1984; Bridge y col.,1994 ). Por el contrario, secciones de nervios completos con pérdida de un segmento dificultan la regeneración axonal por la interrupción del soporte trófico y se produce degeneración del segmento distal (Salonen y col.,1987; Spector y col., 1991; Varon,1993),

### **2.2.1 EVENTOS CELULARES DE LA REGENERACIÓN NERVIOSA**

La regeneración del nervio periférico comprende la formación de brotes axónicos, crecimiento y proyección del axón regenerado y finalmente la reinervación al tejido diana (*formación de placa terminal*) (Spector y col.,1992; Ide C.,1996; Ganong,1997). Se desconocen los factores implicados en la regeneración de nervios periféricos (Aguayo y col.,1982). Sin embargo, estudios *in vitro* e *in vivo* han demostrado la importancia de la matriz extracelular para que suceda el crecimiento de neuritas (Davis y col.,1985; Salonen y col.,1987), La distinta capacidad regenerativa del SNC y SNP esta basada en los diferente composición y localización de la *matriz extracelular*, el SNP contiene gran cantidad de membrana basal y colágena, estas son escasas en el SNC (Salonen y col.,1985, 1987; Sanes y col.,1985). La matriz extracelular está compuesta por *laminina*, *colágena tipo IV*, *fibronectina* y *moléculas adhesivas neurales* (Spector y col.,1993), durante la regeneración actúa como guía de axones y de células de Schwann (Ide C, 1987; Chen YS y col. 1989).

Cuando se tubuliza un nervio seccionado el primer evento necesario para la regeneración nerviosa es la formación, de una matriz fibrinoide acelular que actúa de puente entre ambos segmentos que permita la migración de células no neuronales y el crecimiento axonal (Salonen y col.,1987; Bailey y col. 1993; Varón, 1993); más tarde aparece fibronectina

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

Una vez formada la matriz extracelular y la red fibroblástica, las células de Schwann se reorganizan y migran a lo largo de los puentes de tejido fibroblástico (Salonen y col.,1987; Williams y col.,1993; Guénard y col.,1994; Madison y col.,1994) y se forman rebrotes axónicos conocidos como *pinceles neurofibrilares* (Dumitru, 1994; Smith, 1997), ellos penetran el área dañada, algunos se reabsorben y otros persisten para contribuir en la formación de un axón dominante (*cono de crecimiento axónico*),

Posteriormente, las terminales axónicas continúan su crecimiento emitiendo colaterales (*neuritas*) y se distribuyen con movimientos ameboides hacia el área lesionada (Dumitru, 1994); en mamíferos crecen a una velocidad que va de 0.15 hasta 4.0 mm/día (Varon,1993; Dumitru, 1994; Ganong,1997). Cuando el axón finalmente alcanza la porción distal del tubo, las células de Schwann se alinean, empiezan a enrollarse y forman una estructura membranal multilaminar precursora de la *vaina de mielina* (Dumitru,1994; Smith,1996), en humanos esto sucede dentro de los primeros 9-20 días; así, el axón incrementa su diámetro en una dirección de proximal a distal en un promedio de 4 mm/día (Kable y col.,1988; Dumitru,1994).

Después se separan las células de Schwann y forman los nodos de Ranvier y la región internodal (Dumitru,1994; Ganong,1997).

En humanos, la maduración completa de la vaina de mielina puede tomar hasta un año (Dumitru, 1994, Navarro y col.,1994). Después de la lesión, la recuperación funcional depende de la capacidad de regeneración de los axones lesionados y de la reinervación hacia el órgano diana correspondiente (Navarro y col.,1994). Las funciones nerviosas autónomas, sensitivas y motoras no se restauran totalmente, excepto en niños (Lundborg y col.,1982; Navarro y col.,1994; Ganong, 1997). Alrededor de 1 a 7 fibras nerviosas pueden terminar en el órgano diana (Dumitru, 1994), de ellas, las primeras en regenerarse son las nosiceptivas; los axones de menor diámetro tienen mayor capacidad de reinervar áreas grandes en comparación con axones de mayor calibre y mielinizados (Navarro y col.,1994; Ganong, 1997).

### 2.3 TUBULIZACION DE NERVIOS SECCIONADOS

Aunque los métodos de sutura para la reparación de nervios seccionados se desarrollaron en el siglo XVII (Spector y col.,1991), las técnicas de tubulización nerviosa evolucionaron espontáneamente a la mitad del siglo XIX; (Ramón y Cajal, 1928; Spector y col.,1991). Originalmente se usó la "tubulización" como un método de neurorrafía ante las ausencias de materiales adecuados para sutura (Brian, 1991). La silicona ha sido uno de los materiales más estudiados con modelos animales; un tubo de silicona se coloca entre el extremo proximal y distal del nervio seccionado. De los nervios periféricos, el nervio ciático de la rata ha sido uno de los más estudiados y, de los craneales, la rama bucal superior del nervio facial del conejo (Chongliang col.,1992; 1993; Varón, 1993; Lundborg y col.,1994). Este modelo ha permitido investigar los eventos moleculares y celulares implicados en la regeneración nerviosa (Lundborg y col.,1982; Salonen y col.,1987; Williams, 1987ab; Bates y Kanje y col.,1988; Chen y col.,1989; Danielsen y col.,1991; Spector y col.,1991; Bailey y col.,1993; Min-Sheng y col.,1995).

Otros materiales utilizados para tubulizar han sido (Spector y col.,1991ab, 1992, 1993); gortex (Terris y col.,1993), millipore (Campbell y col.,1961) surgicel (Gabrielson y col., 1966) colágena (Braun y col.,1966), ácido poliglicólico (Pham y col.,1991) y hasta materiales endógenos como duramadre, vena y componentes de membrana basal (Terris y col.,1993; Brian y col., 1991). Recientemente se han analizado biomateriales como la quitosana para usarse mediante tubulización en la regeneración nerviosa (Gómez, 1998).

En los nervios tubulizados se producen los siguientes eventos, a) la cámara actúa como un cable de orientación para el crecimiento de axones y mantiene la comunicación química entre los extremos proximal y distal del nervio seccionado (Brian, 1991; Spector y col.,1991b), y permite que se concentren los factores tróficos y mitógenos naturalmente producidos por los tejidos lesionados (Varon,1993; Spector,1993). El tubo permite la aplicación "*in situ*" de diversos compuestos al nervio lesionado (Kanje, 1988); precursores de matriz extracelular-laminina (Salonen y col.,1987; Bailey y col.,1993), fibronectina (Williams y col, 1987; Bailey y col.,1993), solución salina y plasma (Spector y col.,1991, 1993), factores tróficos y promotores de neuritas FNT y FPN (Chen y col.,1989,1995; Chongliang,1992; Spector y col.,1993; Varón, 1993), factor básico de crecimiento de fibroblastos-bFGF (Danielsen y col.,1988; Bates y col.,1991) factor de crecimiento tipo I semejante a la insulina (IGF-I), entre los principales (Sjöberg y col.,1989).

Se han identificado los principales elementos que modulan la regeneración de nervios tubulizados como; variaciones en el diámetro del tubo (William y col.,1987), distancia entre

los segmentos (Williams y col.,1987; Spector y col.,1991,1993), el uso de compuestos tróficos (NGF) (Kanje y col.,1988; Chongliang y col.,1992); el tipo de materiales (Brian,1991; Terris y col.,1993), el uso de precursores de matriz extracelular, laminina, fibronectina (Bailey y col.,1993) y el tipo de lesión (Hurtado y col.,1987; Dahlin y col.,1988; Douglas y col.,1989; Spector y col.,1992; Rende y col.,1991). Al respecto, cámaras axónicas de 10 mm de longitud permiten una regeneración exitosa del nervio ciático de la rata (Williams y col.,1987); esto no sucede con distancias de 15 mm, o más, por la incapacidad de formación de una matriz extracelular indispensable para la reorganización del nervio en regeneración (William, 1987ab; Rende y col., 1991; Hentz y col., 1993).

### **2.3.1 EFECTOS DE TUBULIZACION EN LA REGENERACION NERVIOSA.**

La regeneración facilitada por los tubos comienza con la concentración de líquido acelular en la cámara axónica (Brian y col.,1991); están presentes suero, sangre, líquido extracelular y *detritus* citoplasmáticos, incluyendo organelos intracitoplasmáticos provenientes de los segmentos nerviosos proximal y distal (Spector y col.,1991) adicionalmente están presentes factores neurotróficos y promotores de neuritas con efecto sobre el crecimiento y migración celular, mitogénesis y elongación de neuritas (Varón, 1993; Ide C,1997; Williams, 1987 ab).

Después inicia el crecimiento de células mesodérmicas, (fibroblastos perineurales) desde ambos extremos seccionados (Williams,1983) Ellos sirven como soporte estructural para orientar la migración de axones y células de Schwann (Salonen y col., 1987; Williams y col.,1987; Bailey y col.,1993); las bandas de fibrina y la colágena forman vías para el rebrote de neuritas y contribuyen a formar el epineurio primitivo (Spector y col.,1991). En este estadio, migran macrófagos fagocíticos (Spector y col.,1991; Varón, 1993). Más tarde las neuritas realizan movimientos ameboides y alcanzan el extremo distal, entonces las células de Schwann envuelven el axón para iniciar el proceso de mielinización (Dumitru,1994); al finalizar este estadio pueden distinguirse axones no mielinizados y en proceso de mielinización (rodeados por células de Schwann) y todavía las neuritas no han alcanzado su órgano diana (músculo) (Spector y col.,1991). Al finalizar este período, los nervios empiezan a agruparse en fascículos separados por estructuras de colágena, fibroblastos perineurales y vainas con células de Schwann, estructuras precursoras del epineurio y perineurio primitivo (Dumitru, 1994, Ganong, 1997).

En este periodo se ha alcanzado una organización fascicular definitiva, el perineurio rodea grupos de axones que continúan su proceso de maduración hasta alcanzar una reorganización (Brian y col.,1991; Spector y col., 991ab; Varon,1993).

Hasta el presente no existe evidencias definitivas de que la utilización de cámaras de crecimiento axónico mejores resultados que los que se obtienen usando suturas (Brian y col.,1991; Terris y col.,1993; Lundborg y col.,1994; 1996; Brian y col.,1991; Terris y col.,1993; Danielsen y col.,1996).

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

## **2.4 ASTROCITOS REACTIVOS.**

Numerosos trastornos del SNC son capaces de desencadenar una respuesta intensa astrocitaria (Dahl y Bignami, 1974; Delacourte, 1990; Hozumi y col., 1990). El fenómeno de activación astrocitaria se conoce como astrocitosis reactiva; consiste en un aumento del número (hiperplasia) y del tamaño de células (hipertrofia) que expresan proteína ácida fibrilar glial (GFAP) (Manthorpone y col., 1986; Reier y Houle, 1988; Eddleston y Mucke, 1993), componente estructural del citoesqueleto astrocitario utilizada universalmente para identificar astrocitos, su incremento indica activación (Dahl y Bignami, 1974; Bignami y Dahl, 1976; Eddleston y Mucke, 1993). Sin embargo, todavía se desconoce el significado biológico de la manifestación de esta molécula (Eddleston y Mucke, 1993). Se ha propuesto que es necesaria para formar prolongaciones citoplasmáticas astrocitarias estables tras lesión o en respuesta a diversos estímulos (Weinstein, 1991), sin embargo, bajo situaciones normales puede incrementarse la expresión de GFAP o de su recambio, sin que haya sucedido reactividad astrogliar (Landry y col.,1990; Mucke y col.,1991).

El aumento del número de astrocitos después de una lesión al tejido nervioso puede deberse a proliferación y migración temprana o la modificación fenotípica de astrocitos locales, sobre todo en lesiones agudas, en las que la proliferación es escasa (Norton y col.,1992). Por otra parte, puede ocurrir un aumento de volumen por edematización astrogliar (Jurlink y col.,1992).

Se ha propuesto, además, la mediación de numerosos factores para el desarrollo de astrocitos reactivos (Noremborg,1994).

Los cambios fenotípicos que sufren los astrocitos reactivos pueden reflejar un aumento metabólico importante y de síntesis de proteínas en respuesta al incremento de sus demandas fisiológicas, como un mecanismo compensador para la reparación del daño tisular (Eddleston y Mucke, 1993).

Durante la reparación de una lesión, los astrocitos pueden desempeñar algunas de las funciones que también realizan las células hematógenas invasoras (Mucke y col.,1991; Eddleston y Mucke, 1993).

No es posible afirmar si la participación astrocitaria produce efectos benéficos o perjudiciales para la posterior reparación del daño (Reier,1989).

Contrariamente, se ha demostrado que los astrocitos reactivos transitoriamente son capaces de expresar propiedades benéficas para los axones en regeneración (Reier,1986), ya que por lo menos en algunas situaciones experimentales promueven la supervivencia neuronal y el crecimiento neurítico (San Pedro y col.,1985; Eddleston y Mucke, 1993), algunos estudios *in vitro* sugieren que los astrocitos por si mismos no son inhibidores para la regeneración (Manthorpe y col.,1986).

## **2.5 USO DE BIOMATERIALES Y COMPUESTOS BIOACTIVOS EN LA REPARACIÓN NERVIOSA.**

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

## **2.6 APLICACIONES DE LA QUITOSANA.**

Entre los usos más comunes de la quitosana están; preparación de cremas cicatrizantes, suturas quirúrgicas, tratamientos dérmicos y capilares, fabricación de lentes de contacto, vehículo para encapsulamiento o liberación prolongada de diversos tipos de fármacos, aditivo dietético para reducción de peso, estabilizador y preservativo de alimentos (Acikgoz, 1995; Soest, 1993).

## **2.7 NEUROESTEROIDES Y REGENERACION NERVIOSA.**

La progesterona ha sido tradicionalmente como la principal hormona gonadal femenina (Testas, 1996), en el cerebro e hipófisis regula el comportamiento reproductivo y la secreción de gonadotropinas (Testas y col.,1996). Recientemente se descubrió que es también un *neuroesteroide*, como tal ejerce funciones neuromoduladoras y actúa como

neurotransmisor sobre el tejido nervioso. Bajo condiciones fisiológicas, en el tejido nervioso lesionado inhibe la astrogliosis y favorece la síntesis de mielina (Testas y col.,1992, 1996).

Los efectos biológicos de la progesterona, y de otras hormonas esteroideas como la pregnenolona de la cual deriva, están mediados por receptores presentes en neuronas y células gliales, incluyendo células de Schwann en el tejido nervioso periférico (Testas y col.,1996). Ha sido demostrado que el neuroesteroide progesterona es sintetizada por células de Schwann e interfiere de medio muy importante durante la regeneración nerviosa (Koenig y col., 1995; Testas y col.,1996).

## **2.8 UTILIZACION DE NEUROESTEROIDES PROGENITORES EN LA REGENERACION NERVIOSA.**

En el nervio ciático de ratones machos, se ha reportado progesterona en concentraciones de  $10.5 \pm 1.1$  ng/g de tejido y en el plasma de  $1.5 \pm 0.2$  ng/ml, después de castración y adrenalectomía persisten niveles de  $7.5 \pm 0.4$  ng/g de progesterona en el nervio ciático del ratón debido a su síntesis "de novo" a partir del colesterol por las células de Schwann (Akwa y col.,1992); además, normalmente existen concentraciones altas de pregnenolona (precursor directo de la progesterona) en el nervio ciático de roedores adultos, lo que apoya la hipótesis de sus efectos sobre la renovación de mielina periférica (Akwa y col.,1992; Koenig y col.,1995). El nervio ciático del ratón lesionado por congelación tuvo una mejor recuperación por la influencia de progesterona; incrementó la velocidad de mielinización después de su administración *in situ* (Koenig y col.,1995).

También se tienen reportes de que las hembras hámster lesionadas en nervios periféricos muestran una regeneración mas rápida que los machos. En otros estudios se redujo la pérdida de motoneuronas después de sección del nervio hipogloso o facial de la rata por el tratamiento con testosterona o progesterona (Yu, 1989), del mismo modo, la administración de testosterona a ratones machos aceleró la recuperación del nervio facial después del aplastamiento, e incrementó la respuesta nucleolar en las motoneuronas periféricas axotomizadas (Kujawa y col.,1991). Tanto la testosterona como el  $17 \beta$ -estradiol han producido efectos favorables sobre la recuperación de nervios periféricos lesionados por aplastamiento (Yu, 1989), todo estos resultados en su conjunto demuestra que los esteroides gonadales son capaces de facilitar la recuperación del tejido nervioso lesionado, ya sea activando o acelerando las respuestas reparativas neuronales (Jones, 1993,1997; Kujawa y col.,1991).

### 3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.

A pesar de todos los progresos la reparación de lesiones en nervios, el tiempo posesión en que se realiza la neurografía y la extensión del daño son las principales limitaciones, y inclusive cuando se utiliza el recurso de "tubulización" para formar una cámara de crecimiento axónico.

Para resolver lo anterior, se a ensayado con el uso "neuroesteroides" compuestos neurotróficos que inducen la síntesis de mielina y favorecen la supervivencia de neuronas axotomizadas (Baulieu, 1981). El uso de pregnenolona, progesterona y la combinación con biomateriales pueden lograrse mejores resultados y entre los biomateriales destaca la "quitosana" que resulta de la desacetilación de la quitina; (caparazón de camarones) es biodegradable, hipoalergénica, se puede modificar su permeabilidad y elasticidad y actúa como un vehículo para la liberación prolongada de sustancias por lo que resulta adecuada para formar prótesis nerviosas.

Con el propósito de analizar los efectos de una prótesis bioactiva sobre la reparación del nervio ciático de perro adulto se realizó este estudio, en el que se usará tubos de "quitosana" y los neuroesteroides progesterona y pregnenolona "in situ".

De los resultados que se obtengan puede ser posible proponer el uso de prótesis bioactivas para reparación quirúrgica en seres humanos afectados por una pérdida extensa de tejido nervioso periférico aunque, para lo cual serán necesarios estudios adicionales. Seleccionamos el perro para este estudio exploratorio debido a que su sistema inmunológico es mucho más sensible que el de roedores, además de que su calibre nos permitirá someter a prueba las cualidades físicas del biomaterial en una aproximación cercana a lo que sucedería por su aplicación en seres humanos.

#### 4. HIPOTESIS.

Mediante el uso de prótesis de "quitosana" como vehículo para liberación prolongada de pregnenolona y progesterona se favorece la regeneración del nervio ciático del perro axotomizado y tubulizado.

#### 5. OBJETIVOS GENERALES.

1.- Analizar las propiedades del biomaterial "quitosana" para desarrollar prótesis bioactivas que faciliten la recuperación nerviosa.

2.- Determinar si el tratamiento "in situ" con pregnenolona o progesterona favorece la regeneración del nervio ciático axotomizado y tubulizado con quitosana.

3.- Analizar los efectos de la prótesis bioactivas de "quitosana" sobre astrogliosis en el dominio medular del nervio ciático axotomizado y tubulizado.

4.- Valorar la velocidad de recuperación de la pierna lesionada mediante restauración de la capacidad de deambulación del animal y sensibilidad a la presión en el espacio interdigital.

## 6. MATERIALES Y METODOS.

El presente trabajo se realizó en los laboratorios de "Neuroendocrinología" celular del Centro de Investigación Biomédica de Occidente (IMSS) y de "Morfofisiología" del departamento de medicina veterinaria del CUCBA de la Universidad de Guadalajara.

Los perros fueron proporcionados por el centro Antirrábico municipal de Zapopan, Jalisco, todos ellos fueron seleccionados de una talla chica con un peso aproximado de 10 Kg. de peso clínicamente sanos.

Las etapas más importantes del estudio se describen a continuación.

### 6.1 Elaboración de *quitosana*.

A continuación se describe el procedimiento;

Deshidratación de caparazones de camarón 48 hrs en una estufa a 60° C.

Pulverización y homogeneización del material desecado.

Desnaturalización y precipitación de proteínas con NaOH.

Lavados con tampón tris pH 8.

Desmineralización con HCl del concentrado glucósido libre de proteínas.

Lavados con tampón tris pH 8.

Secado durante 48 Hrs.

Desacetilación con NaOH del material desecado con temperatura entre 100-120°C.

Lavado y secado.

Al final de este procedimiento se obtienen hojuelas delgadas y blancas de *quitosana* solubles en ácido acético ( $\text{CH}_3\text{COONa}$ ) al 0.1 N, pH 4.6 y una mezcla de agua destilada con 3 gramos de estas hojuelas. Una vez hecha la mezcla se agregan los neuroesteroides, agitándose hasta homogenizarlos para después vaciarlos sobre tubos capilares de teflón y provocar la precipitación de la *quitosana* alrededor del tubo con baños de hidróxido de amonio al 50%. después se hacen lavados en agua destilada para eliminar el solvente, resultando un tubo con las mismas dimensiones del tubo de silicona, que en este caso fueron de 35 mm de longitud con 4 mm de luz y 1.5 mm de espesor en sus paredes. Los tubos de *quitosana* elaborados se mantuvieron almacenados en alcohol isopropílico al 90% hasta ser utilizados.

### **Diseño experimental.**

En todos los animales se seccionó 30 mm del nervio ciático.

#### **Controles, n=4**

1.- El segmento seccionado fue reemplazado por una prótesis de "quitosana" sin neuroesteroides y en la zona del implante se colocó una malla hemostática de colágena impregnada con solución salina.

#### **Experimentales n=4**

2.- El segmento nervioso seccionado se sustituyó por una prótesis de "quitosana" con progesterona embebida en sus paredes (10 mg/2 ml) y se aplicó una malla hemostática impregnada con progesterona en la misma concentración.

3.- La prótesis de "quitosana" contenía pregnenolona embebida en sus paredes (10 mg/2 ml) y la misma malla.

Se utilizaron 12 perros de raza criolla machos adultos jóvenes con un peso máximo de 10 kg. repartidos en tres grupos de cuatro animales; un grupo control y dos experimentales, todos se mantuvieron en condiciones controladas de bioterio del CENTRO DE INVESTIGACIONES BIOMEDICAS DE OCCIDENTE (IMSS) con ciclos de 12 hrs luz y 12 hrs oscuridad, con agua y alimentación balanceada "ad libitum". En todos ellos se practicó sección del nervio ciático izquierdo (30 mm) y se les implantó una prótesis para formar una cámara de crecimiento axónico mediante tubulización nerviosa, utilizando el biomaterial "quitosana". En el interior de las cámaras controles y experimentales se depositó solución salina isotónica, en los animales experimentales los tubos de "quitosana" estuvieron impregnados en sus paredes con los neuroesteroides pregnenolona o progesterona. Una vez fijada la prótesis mediante sutura epineural, el segmento lesionado del nervio se envolvió con una malla de colágena saturada con una solución de 0.9% de cloruro de sodio en los animales controles y con 63 mg/ml de pregnenolona o progesterona en los experimentales.

### **6.2 Procedimiento quirúrgico de axotomía-tubulización.**

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

Mediante disección roma se separaron los haces musculares sin seccionarlos, hasta descubrir el nervio ciático, éste se liberó de sus tejidos circundantes y se seccionó un segmento

de 30 mm a nivel del tercio superior del muslo para después sustituirlo con el tubo de quitosana. Para evitar la pérdida del contenido axonal de ambos segmentos, inmediatamente después de la axotomía se insertaron 2 mm del muñón axónico proximal y distal en los extremos de un tubo de "quitosana" de 40 mm de longitud con 3 mm de diámetro externo y 5 mm de diámetro interno y los muñones del nervio se fijaron al tubo mediante dos puntos de sutura epineural con nylon 10-0, formando así una cámara de crecimiento axónico de 40 mm de longitud, en cuyo interior se inyectó solución salina al 0.9 % mediante una micro-jeringa *Hamilton*. Las prótesis de "quitosana", antes de su colocación, fueron preincubadas durante 2 hrs a 37° C en solución salina al 0.9 %. Sobre la zona de lesión nerviosa, cubriendo los extremos proximal y distal del nervio, se colocó la esponja de colágena de 3x5cm (Braun Melsungen AG D-34209) impregnada con solución salina fisiológica (controles), pregnenolona o progesterona (experimentales).

La herida quirúrgica se reconstruyó por planos con catgut crómico 4-0 y puntos simples separados en piel con nylon 2-0. Los animales se recuperaron en un ambiente tibio antes de regresarse a sus condiciones habituales de bioterio. Al finalizar la cirugía se aplicó una inyección intramuscular profunda de una solución de penicilina benzatínica de 800,000 UI para prevenir una infección posible y, durante el periodo postoperatorio, diariamente se realizó un examen clínico de cada animal y se practicó curación de la herida quirúrgica. Diez días después de la axotomía, realizamos la primera evaluación de la evolución de la lesión mediante observación de la capacidad de locomoción del animal y análisis de la sensibilidad de la pierna, aplicando presión en el espacio interdigital de la pata lesionada. Esta prueba se repitió cada 10 días hasta completar 120 días postlesión. A través del estudio todos los procedimientos se realizaron bajo condiciones asépticas y siguiendo las recomendaciones de los Institutos Nacionales de Salud de los Estados Unidos de Norteamérica (NIH) para el manejo y la utilización de animales de laboratorio para experimentación.

### **6.3 Perfusión intravascular para fijación.**

A los 30, 60, 90 y 120 días postlesión tres animales, uno de cada grupo, fueron sacrificados mediante perfusión intravascular a través del sistema carótida-yugular; para ello recibieron una inyección subletal (I.V.) de pentobarbital sódico (50 mg/kg), una vez anestesiados (a temperatura corporal y bajo una presión de 120 cm<sup>3</sup> de agua), se hicieron pasar 500 ml de solución salina isotónica al 0.9%, conteniendo 1gr de procaina y 10,000.00 unidades de heparina/litro para eliminar la mayor cantidad de sangre, luego se hicieron pasar durante 10 min., 1 Lto. de solución fijadora compuesta por 4 % de paraformaldehído disuelto en tampón de fosfatos 0.1 M, pH 7.4. Del animal fijado se diseccionó el segmento nervioso

axotomizado y tubulizado con quitosana, este fue fijado adicionalmente por inmersión en la misma solución fijadora a 4°C durante 24 hrs, también se diseccionó el segmento de la columna vertebral correspondiente al área de dominio medular del nervio ciático; entre la sexta vértebra lumbar y la segunda sacra, el bloque de tejido se fijó adicionalmente por inmersión durante 8 hrs a temperatura ambiente en la misma solución fijadora y se separó la médula espinal, ella fue lavada mediante tres cambios de 20 min. en tampón fosfato.

#### **6.4 Inmunocitoquímica de las zonas medulares de dominio del nervio ciático para análisis de astrogliosis.**

El segmento de médula espinal, que contenía las regiones L6, L7, S1 Y S2, se sumergió a 4°C durante 48 hrs en solución crioprotectora compuesta por 30% de sacarosa y 0.5% de goma arábiga disueltas en solución PBS pH, 7.4 al 0.1M y se hicieron cortes de 40 µm por congelación en un criostato, fueron recogidos en solución tampón de fosfato salino (PBS) 0.1M, esto con el propósito de realizar el estudio inmunocitoquímico mediante la técnica de flotación libre, para proteína ácida fibrilar glial, indicativa de gliosis reactiva en respuesta al daño nervioso.

Todos los anticuerpos (Ac) fueron disueltos en PBS 0.1 M a pH 7.2 con 0.1% de albúmina sérica bovina y 0.2% de Tritón X-100, esta misma solución se utilizó para los lavados del tejido que se hicieron después de cada etapa de incubación. La incubación con el Ac primario; Ac generados en conejo contra GFAP de médula espinal de bovino (inmunógeno) en dilución 1:700, (Dako Z-0334), se realizó durante una noche a 4 °C con agitación suave.

La incubación con el Ac secundario; IgG generadas en cerdo contra IgG de conejo en dilución 1:250, (Dako Z-0196), fue durante 2 hrs a temperatura ambiente y la incubación con el compuesto cromógeno PAP 1:250 (complejo peroxidasa antiperoxidasa de conejo Dako Z-113) se hizo durante 1.5 a 2 hrs a temperatura ambiente y en oscuridad. El revelado de la reacción se realizó mediante incubación de los tejidos en una solución al 0.07% de 3'3'-diaminobencidina (DAB Sigma 5637) con 0.1% de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, durante 10-15 min hasta que aparece un color marrón.

#### **6.5 Histoquímica del dominio medular del nervio ciático para determinar sobrevivencia neuronal tras axotomía-tubulización.**

En cortes coronales de las zonas de dominio del nervio ciático axotomizado y tubulizado montados en portaobjetos gelatinizados y sometidos a deshidratación mediante cambios sucesivos de 3 minutos en concentraciones crecientes de alcohol; 70, 80, 90% y alcohol absoluto, luego los cortes fueron sumergidos durante 1 minuto en solución alcohólica (80%) de eosina amarillenta, seguida de dos lavados rápidos en alcohol al 96 y 100% e

inmersión durante 2 o 3 minutos en una solución al 0.5% de acetato de violeta de cresilo (colorante de Nissl, Sigma 5042) y se realizó un estudio cualitativo de la población neuronal en la región medular del nervio ciático axotomizado para identificar cualquier indicio degenerativo como cromatólisis, cariorrexis, excentricidad nucleolar o basofílica y grado de compactación del neuropilo para detectar la presencia de espacios vacíos con remanentes membranales sugestivos de necrosis neuronal.

#### **6.6 Inclusión en resinas epóxicas del muñón distal del nervio seccionado para análisis con microscopía de luz.**

El muñón distal del nervio seccionado, al momento de sustraer los restos de las prótesis, fue fijado por inmersión en una solución al 4% de paraformaldehído amortiguado en fosfatos 0.1 M, pH. 7.4 durante 24 hrs, el nervio fijado se lavó mediante tres cambios de 20 min. en tampón de fosfatos 0.1 M para eliminar los restos de fijador. Del nervio lavado se obtuvieron fragmentos de 1 mm de longitud y se seleccionaron fragmentos representativos del punto de sutura epineural del segmento distal y el tubo de quitosana. Los fragmentos se procesaron para su inclusión en resinas epón para su análisis con microscopía de luz, siguiendo el procedimiento que se describe.

Los fragmentos de tejidos fueron lavados mediante tres cambios de 15 min. con tampón fosfatos 0.1 M y luego se inició la osmificación con tetróxido de osmio al 1% en tampón fosfatos 0.1M a pH. 7.4 durante 2 hrs para después seguir con su deshidratación; inicialmente se hicieron dos pases de 20 min. en soluciones de alcohol al 30, 50 y 70%, luego los fragmentos de tejido fueron sumergidos sucesivamente en mezclas de alcohol al 90, 96% hasta llegar al alcohol absoluto, se hicieron dos cambios de 15 min. con cada mezcla. Para completar la deshidratación se utilizó una mezcla de partes iguales de alcohol absoluto y óxido de propileno, los tejidos se sumergieron en esta solución durante 10 min. y fueron transferidos a una solución de óxido de propileno, allí permanecieron durante 15 min.

Los tejidos deshidratados fueron preincluidos mediante inmersión durante 20 min. en una mezcla compuesta por resinas epón disueltas en óxido de propileno en proporción 1:3, seguidos de inmersión en una mezcla compuesta por partes iguales de resinas epón y óxido de propileno, luego los tejidos se sumergieron durante el mismo periodo de tiempo en una mezcla formada por tres partes de resina y una de óxido de propileno y transferidos a resinas epón pura durante una hora y finalmente fueron incluidos en cápsulas Been rellenas con resina epón nueva. Las cápsulas con los tejidos fueron polimerizadas a 60°C durante 48 hrs.

De los tejidos incluidos en resinas se hicieron cortes de 1µm de espesor con un ultramicrotomo Sorvall, fueron montados en portaobjetos y teñidos con azul de toluidina y

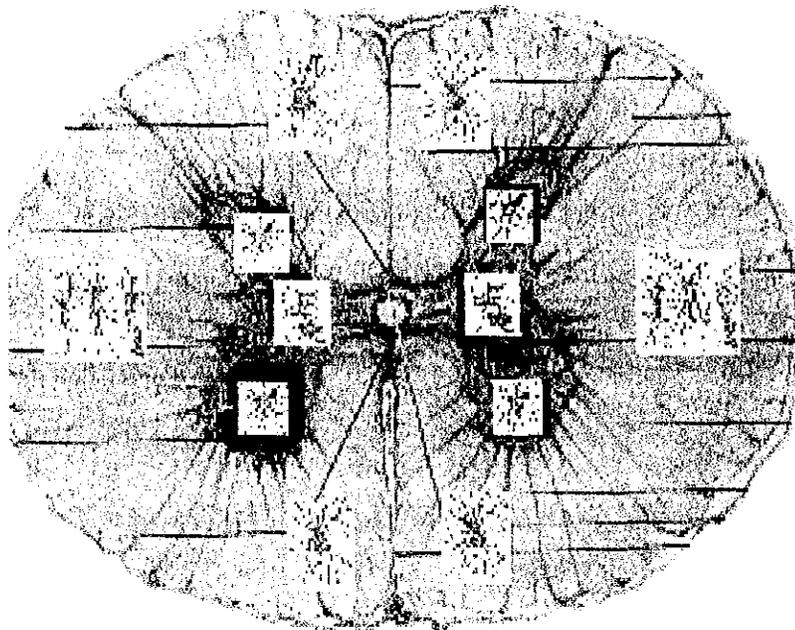
examinados con microscopía de luz para determinar los parámetros indicativos de la organización general del nervio.

### **6.7 Análisis morfométrico de transformación astrocitaria con microscopía de luz.**

Una vez realizada la técnica inmunocitoquímica para proteína ácida fibrilar glial (GFAP), en todos los cortes de tejidos se cuantificó el número de astrocitos y su densidad de superficie en los segmentos medulares L7 y S2 de todos los animales, control y experimentales, para ello se utilizó un sistema automatizado para análisis de imagen (Q550IW Leica).

Utilizando la siguiente fórmula para determinar la cantidad de tejido a cuantificar  $n =$  desviación estándar al cuadrado sobre la varianza de la población. En donde la  $n =$  a cuantificar fue de 136 campos que suman un total de  $2.5 \mu\text{m}^2$  con el objetivo de  $40 \times 100$  por región medular de cada animal sacrificado y como se puede observar en la figura 4 la sustancia blanca de ambos lados se dividió en dos campos dorsales, dos laterales y dos ventrales y lo mismo se realizó con la sustancia gris al final, la suma del número de astrocitos y la superficie ocupada por los astrocitos observados en este número de campos del lado lesionado se comparó con el contralateral (no lesionado) y los resultados se analizaron mediante la prueba estadística de análisis de varianza aleatoria de dos vías (ANOVA) comparando los grupos a través del curso temporal después de la axotomía tubulización (30, 60, 90 y 120 días).

Se utilizó la prueba de Duncan para las comparaciones *post-hoc* de los valores de medias, además se estableció un nivel de confianza de  $P < 0.05$ . Para definir como significativas las diferencias en todos los animales, se compararon las características estructurales del segmento medular contralateral del nervio ciático, con el axotomizado-tubulizado.



**Figura 4.-** La figura muestra un corte transversal de médula espinal, los recuadros comprenden la forma sistemática como se realizó el muestreo para análisis de astrogliosis en cortes de 40  $\mu\text{m}$  de espesor de médula espinal.

## 7. RESULTADOS.

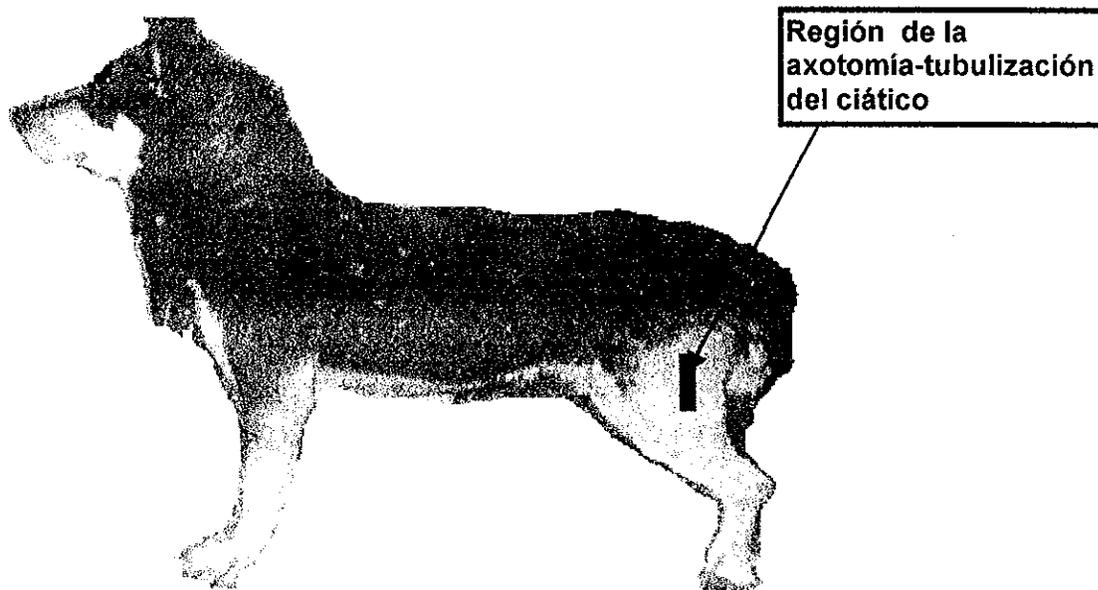
Se logró moldear de manera artesanal tubos de quitosana con los neuroesteroides precargados en sus paredes con una resistencia y tenacidad apropiada para remplazar el segmento seccionado. Dentro de la primera semana, después de la cirugía, se observó una cicatriz organizada en los bordes de la herida, se retiraron las suturas y la piel finalizó su cicatrización, posteriormente, en el periodo comprendido entre 15 y 20 días, no se observó inflamación en la pierna lesionada, ni signos de dolor a la presión, indicadores de una adecuada tolerancia a la presencia de la prótesis de quitosana y de que el manejo quirúrgico de axotomía-tubulización produjo traumatismo mínimo.

En el periodo comprendido entre 20 y 30 días después de la cirugía, se observó recuperación motora de la pierna lesionada en todos los grupos de animales, ellos empezaron a recuperar la capacidad para extenderla y flexionarla, lo que les permitió deambular de forma casi normal, excepto por un déficit que se presentó en cuatro de los animales pertenecientes a los tres grupos, este consistió en una flexión sostenida de los metatarsos y falanges; responsable del arrastre del dorso de los dedos, pero que no fue motivo para sacrificarlos antes de los tiempos establecidos.

Posteriormente, cuando habían transcurrido sesenta días después de la lesión, ocho de los 12 animales que mostraron este déficit recuperaron la normalidad, pero dos perros del grupo control y uno de cada grupo experimental que fueron tratados con pregnenolona o progesterona, no lograron recuperarse.

A los 120 días después de la lesión no se produjo más mejoría, en esta etapa se alcanzó recuperación sensitiva del miembro lesionado de todos los animales, al ejercer presión en el espacio interdigital entre el tercer y cuarto dedos la pierna se retraía con fuerza signo indicativo de restauración de la función sensitiva. Estos resultados fueron analizados mediante una prueba no paramétrica de  $X^2$ , ella indicó que sí se produjeron diferencias en la capacidad de recuperación motora y sensitiva de la pierna lesionada por sección y tubulización de un segmento del nervio ciático, atribuibles al tratamiento con los neuroesteroides progesterona o pregnenolona figura 6.

Con excepción de los animales que arrastraban el dorso de los dedos de las piernas, en los que se produjo ulceración por fricción e infección grave, no se presentaron infecciones en el resto de los animales, todos ellos recuperaron el tono motor de la pierna lesionada como se ilustra en la figura 5.



**Figura.- 5** Vista lateral izquierda del perro que muestra la pierna lesionada en extensión normal y con apoyo plantígrado sobre los tarsos y metatarsos.

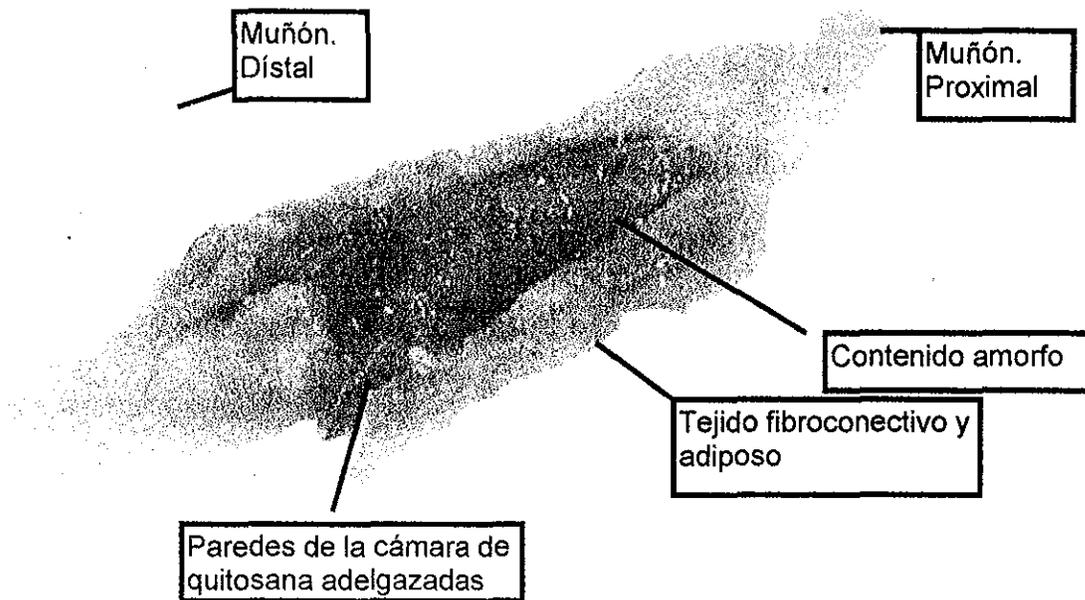
Días post-lesión	30	60	90	120	Proporción de éxito
<b>Grupo</b>					
<b>Control</b>	2	2	2	2	2/4 = 0.86
<b>Progesterona</b>	2	3	3	3	3/4 = 0.71
<b>Pregnenolona</b>	3	3	3	3	3/4 = 0.71

**Figura.- 6** Resultados de la prueba de  $X^2$ , muestra el número de perros que recuperaron la función motora y sensitiva a través del curso temporal no obstante que no resultan significativas las diferencias entre animales controles y tratados con los neuroesteroides; se observa un efecto benéfico de estos y la acción favorable de la prótesis de "quitosana".

**Análisis macroscópico de las prótesis.**

En un solo animal, de los recuperados del grupo control sacrificado a los 120 días poslesión, no se localizó la cámara de tubulización al momento de realizar la disección final en el sitio donde fue colocada esta solamente fue posible distinguir tejido conectivo, fibroso y adiposo, entre los que posiblemente había fibras nerviosas que no fue posible identificar al separar los tejidos. En el resto de los animales sacrificados, se localizó la cámara de quitosana sin ninguna dificultad en la misma posición como fue fijada. En todos los animales tubulizados, los muñones nerviosos proximal y distal se mantuvieron fijos en el interior de la cámara y no se produjo desgarre de las suturas epineurales, por lo que, la falta del crecimiento nervioso, no fue debido a una falla quirúrgica.

En ninguno de los animales controles y experimentales sacrificados a los diferentes tiempos poslesión; 30, 60, 90 y 120 días, se observó crecimiento nervioso en el interior del tubo de quitosana. La cámara de crecimiento axónico se observó de una coloración marrón-oscuro, y fue posible identificar visualmente un mayor adelgazamiento de las paredes con el tiempo transcurrido después de la lesión, esto indicó que la quitosana sufrió ataque de lisozimas tisulares que, en un periodo mayor de tiempo conducirían hasta su desaparición completa. El mayor desgaste de las paredes de la cámara se observó a los 120 días, en este estadio había ocurrido infiltración de tejido fibroconectivo y vascular en el contenido de la cámara. Inicialmente las cámaras tenían 1.5 mm de espesor al momento de implantarlas debido a que fueron elaboradas mediante la superposición de 20 capas de quitosana, a los 120 días el espesor promedio de sus paredes fue menor a 0.5 mm, por esta razón su consistencia se volvió quebradiza al manipularlas, sobre la superficie de las cámaras también se observó tejido adiposo infiltrado en forma difusa, sin que fuera posible distinguir ningún crecimiento nervioso, (figura 7).



**Figura.- 7** Se distingue una matriz presente ocupando todo el interior del tubo de quitosana, mediante análisis microscópico se distinguieron componentes celulares de tipo inflamatorio (monocitos, plaquetas y linfocitos), así como células precursoras de lámina basal (fibroblastos). En ninguna de las cámaras se observó material piógeno, no obstante que las prótesis implantadas no fueron esterilizadas por métodos físicos.

#### **Estudio histoquímico de supervivencia neuronal.**

Una parte de los cortes fueron destinados a tinción con la técnica de Nissl para identificación de neuronas, en ninguna de las regiones examinadas se observó necrosis neuronal a través del curso temporal después de axotomía-tubulización. En los primeros estadios poslesión (30 y 60 días), las neuronas presentes en las zonas medulares axotomizadas mostraron incremento del espacio de Virchow-Robins, indicativo de alteración de los mecanismos normales de regulación de permeabilidad de las membranas, posteriormente, en estadios más avanzados (90 y 120 días), las neuronas revelaron aspecto normal, lo que demuestra que estos efectos fueron transitorios y la lesión nerviosa no produjo necrosis neuronal en la zona medular de dominio del nervio ciático exacto a la mitad tubulizada (figura 8).



**Figura 8.-** Corte coronal de médula espinal correspondiente a la séptima lumbar, las flechas indican neuronas motoras de aspecto normal con cuerpos de Nissl en su citoplasma y alrededor de los somas neuronales se distinguen núcleos de células gliales, principalmente astrocitos inmersos en un neuropilo de aspecto compacto. (espesor de corte 50 $\mu$ m) 400x, técnica de Nissl.

#### **Análisis de inmunoreactividad para proteína ácida fibrilar glial (GFAP).**

Con el propósito de analizar los efectos de la prótesis de quitosana y del tratamiento *"in situ"* con los neuroesteroides progesterona o pregnenolona, sobre el tejido nervioso diana axotomizado en la médula espinal, se realizaron diferentes comparaciones;

1.- Se analizó la respuesta astrocitaria en el lado medular ipsilateral a la lesión y en el contralateral, en desconocimiento de la identidad de las muestras por el observador.

Se obtuvieron registros de todos los animales controles; implantados con las prótesis de quitosana, pero sin tratamiento "IN SITU" con neuroesteroides y los experimentales que también fueron implantados con prótesis, pero que además recibieron la influencia de progesterona o pregnenolona en la zona de la lesión y por el exterior de la cámara y sacrificados a los 30, 60, 90 y 120 días después de la axotomía-tulización.

Se estudió el número de astrocitos y la transformación de su citoplasma analizado mediante cálculo de densidad de "Densidad de Superficie" usando el sistema automático para análisis de imágenes (Leica). Debido a que en todos los cortes de tejidos medulares analizados pertenecientes a perros controles y experimentales se distinguió la mayor inmunoreactividad en los segmentos lumbares 7, y sacra 2, todo el análisis de astrocitosis se concentro en estas regiones. Los resultados obtenidos se muestra en las figuras 13-24, se ilustra por separado el número de astrocitos y su densidad de superficie, indicativa de la transformación ocurrida en el citoesqueleto del citoplasma astrocitario como un mecanismo de respuesta a la lesión nerviosa, cuyo significado biológico todavía no ha sido demostrado.

**Número de astrocitos en el segmento séptimo de la médula espinal comparación entre el lado (ipsilateral a la lesión) y el contralateral.**

Días	30		60		90		120	
grupos	Contra.	Ipsilate.	Contra.	Ipsilat.	Contra.	Ipsilat.	Contra.	Ipsilat.
Control	502	646	261	338	393	522	396	464
Progesterona	220	326	200	269	128	193	389	446
Pregnenolona	174	237	152	179	179	238	205	279

**Figura.- 9** Población astrocitaria presente en una superficie analizada de 25 mm<sup>2</sup> del lado medular ipsilateral y contralateral a lesión del nervio ciático a través del estudio en todos los animales controles y experimentales. El segmento medular ipsilateral reveló una mayor cantidad de astrocitos así mismo resulta evidente el efecto inhibitorio de los neuroesteroides sobre la gliosis reactiva, los mejores resultados se obtuvieron por el efecto de la pregnenolona.

**Transformación del citoplasma astrocitario evaluado mediante calculo de densidad de superficie del séptimo segmento medular.**

Días	30		60		90		120	
grupos	Contra.	Ipsilate.	Contra.	Ipsilat.	Contra.	Ipsilat.	Contra.	Ipsilat.
Control	41,545	52,254	18,847	29,725	27,804	40,573	28,250	35,986
Progesterona	19,205	25,354	12,818	20,261	10,001	15,604	27,470	32,316
Pregnenolona	8,132	10,639	7,361	9,529	10,097	13,859	10,721	32,316

**Figura.- 10** Los valores corresponden a  $\mu\text{m}^2$  de superficie ocupada por astrocitos en 25 mm<sup>2</sup>, los datos se relacionan con el fenómeno manifestado al analizar la población astrocitaria. Los astrocitos con mayor superficie citoplasmática corresponden al segmento medular ipsilateral a la lesión nerviosa, tanto en controles como experimentales a través de los diferentes periodos analizados. Los tejidos de animales controles tubulizados con quitosana y sin tratamiento "IN SITU" con neuroesteroides, mostraron fluctuaciones de la densidad se superficie a lo largo del estudio, mientras que en los tejidos de animales tratados con los neuroesteroides progesterona y pregnenolona la transformación del citoplasma astrocitario fue menor y se mantuvo mas tarde en los distintos periodos de tiempo estudiado, sin embargo, al 120 poslesión los tres grupos revelaron valores comparables, las fluctuaciones de astrogliosis puede deberse a la distancia donde se producen la lesión nerviosa, los neuroesteroides produjeron efectos inhibitorios sobre la reactividad astrocitaria.

### Número de astrocitos en el segundo segmento medular sacro.

Días	30		60		90		120	
grupos	Contra.	Ipsilate.	Contra.	Ipsilat.	Contra.	Ipsilat.	Contra.	Ipsilat.
Control	289	358	397	549	431	554	396	464
Progesterona	230	301	374	468	246	361	359	463
Pregnenolona	180	243	277	350	268	333	245	320

**Figura .-11** El análisis se realizó de la misma forma descrita en el lado ipsilateral a la lesión, también mostró una mayor cantidad de astrocitos en todas las preparaciones controles y experimentales examinadas a través del tiempo, y a pesar de que en algunos estadios se manifestó efecto inhibitorio de ambos neuroesteroides la pregnenolona reveló el efecto más potente a lo largo del estudio con mayor disminución de astrocitos 120 días posesión.

### Transformación del citoplasma astrocitario evaluado mediante calculo de densidad de superficie del séptimo segmento medular.

Días	30		60		90		120	
grupos	Contra.	Ipsilate.	Contra.	Ipsilat.	Contra.	Ipsilat.	Contra.	Ipsilat.
Control	18,253	25,565	30,606	51,254	29,553	38,239	33,806	48,770
Progesterona	10,851	15,347	25,786	35,051	11,237	19,548	32,978	38,431
Pregnenolona	10,224	15,627	1,382	1,916	18,787	25,001	14,252	21,035

**Figura .- 12** Los resultados fueron comparables a los descritos para el segmento séptimo de la médula espinal; solo que en estos tejidos fueron más evidentes los efectos inhibitorios de progesterona que pregnenolona a través del estudio. En comparación con los valores obtenidos del grupo de animales de controles sin tratamiento con neuroesteroides, al finalizar el estadio (120 días) los mejores resultados fueron obtenidos por el tratamiento con pregnenolona, compuesto progénico de todas las diferentes clases de neuroesteroides.

**Análisis de población y densidad de  
superficie astrocitaria en el séptimo segmento  
medular lumbar**

**Nota\*** Los cuadros que se muestran a continuación presentan los valores graficados en la figuras 17-24 correspondientes a la comparación de la población astrocitaria y la densidad de superficie del segmento medular ipsilateral a la lesión del control y tratados con neuroesteroides en comparación con el tejido medular contralateral a la lesión de los controles, considerado como el patrón mas cercano a la normalidad. Se analizó la inmunoreactividad a través de los distintos estadios examinados (30, 60, 90 y 120 días posesión).

#### Segmento medular séptimo

**Porcentaje de incremento del número de astrocitos respecto al nivel basal obtenido del lado contralateral a la lesión de perros controles considerados como 0.**

Días	30	60	90	120
Grupos				
Control	28.68 %	29.50 %	32.82 %	17.17 %
Progesterona	48.18 %	34.50 %	50.78 %	14.65 %
Pregnenolona	36.20 %	17.76 %	32.96 %	36.09 %

**Figura .- 13** Al establecer este tipo de comparación se hace evidente que la lesión provoco un aumento de la cantidad de astrocitos inmunoreactivos para GFAP en todos los tejido medulares contralaterales a la lesión, y a través del curso temporal analizado, los menores incrementos se observaron en tejidos controles de animales lesionados pero sin tratamiento hormonal, y el efecto comparable al de tejidos controles fue producido por progesterona a los 120 días posesión en esta etapa produjo incremento de la inmunoreactividad pero no es posible afirmar que el mayor porcentaje de astrocitos esta en los tejidos de animales experimentales y que este tenga un significado, tomando en cuenta la tendencia de los grupos hacia la normalización.

**Porcentaje del incremento de la densidad de superficie del lado ipsilateral a la lesión nerviosa.**

Días	30	60	90	120
Grupos				
Control	25.77 %	57.71 %	42.92 %	27.38 %
Progesterona	32.01 %	58.06 %	50.00 %	17.64 %
Pregnenolona	30.81 %	29.43%	37.25 %	49.19 %

**Figura.- 14** A lo largo del tiempo posesión se produjo un incremento importante de astrogliosis, a los 60 días en tejidos controles, constantemente esto se produjo progresivamente hasta llegar a valores cercanos a la normalidad y en el ultimo estadio analizado se presento un comportamiento semejante, resultado del tratamiento con progesterona, mientras que la pregnenolona mantuvo niveles variables de astrogliosis hasta el día 30 y un incremento a los 120 días pero se observa que los mejores efectos fueron por la progesterona.

**Análisis de población y densidad de superficie astrocitaria en el segundo segmento medular sacro**

### Segundo segmento medular sacro

Porcentaje de incremento del número de astrocitos del lado ipsilateral a la lesión nerviosa.

Días	30	60	90	120
Grupos				
Control	26.74 %	38.28 %	28.53 %	27.40 %
Progesterona	30.86 %	25.13 %	36.74 %	28.96 %
Pregnenolona	35.00 %	26.35 %	24.25 %	30.61 %

**Figura.- 15** En los tejidos controles la población astrocitaria se mantuvo constante a lo largo del estudio, acción semejante fue observado al analizar cortes de médula espinal de grupos tratados con neuroesteroides; a los 120 días se obtuvieron resultados semejantes en los cortes de tejidos controles y experimentales. Los neuroesteroides "IN SITU" no inhibieron la reactividad astrocitaria, como se observa.

Porcentaje del incremento de la densidad de superficie del lado medular ipsilateral a la lesión nerviosa, respecto al nivel 0 del lado contralateral a lesión de perros controles.

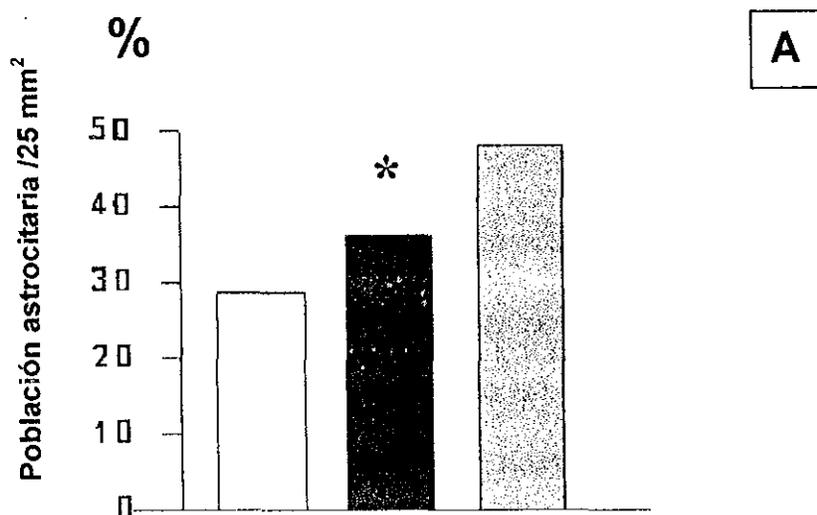
Días	30	60	90	120
Grupo				
Control	40.06 %	67.46 %	29.39 %	40.00 %
Progesterona	41.43 %	35.92 %	73.95 %	16.53 %
Pregnenolona	52.84 %	38.62 %	34.67 %	32.58 %

**Figura.- 16** Para esta región el tratamiento con neuroesteroides sí produjo disminución de la transformación astrocitaria al final del estudio (120 días), tanto por progesterona como pregnenolona, los mejores resultados correspondieron a progesterona y al termino del estudio la inmunoreactividad persistió el tejidos controles y se redujo hasta limites cercanos a la normalidad por el tratamiento con neuroesteroides.

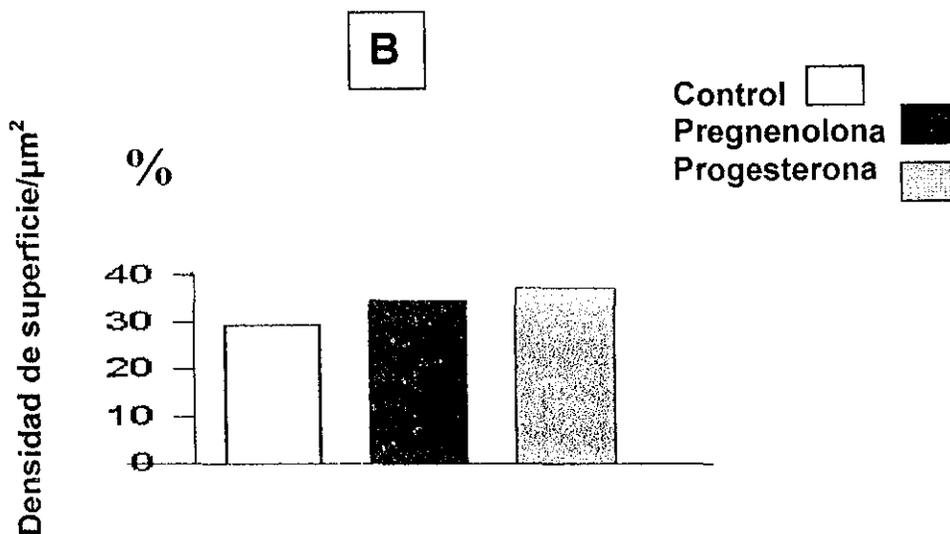
## **Séptimo segmento medular**

**Se muestran las gráficas que indican el porcentaje de incremento en el número de astrocitos y la densidad de superficie astrocitaria en comparación con el lado contralateral a la lesión nerviosa en cortes de médula espinal de los tres grupos control y experimentales.**

### Análisis de la astrglosis reactiva 30 días posesión



**Figura 17-A.-** En esta etapa del estudio se hizo evidente que no hubo descenso de la población astrocitaria inmunoteñidas con GFAP en cortes de médula espinal de los grupos tratados con neuroesteroides, sin embargo, la pregnenolona tubo mejor efecto.



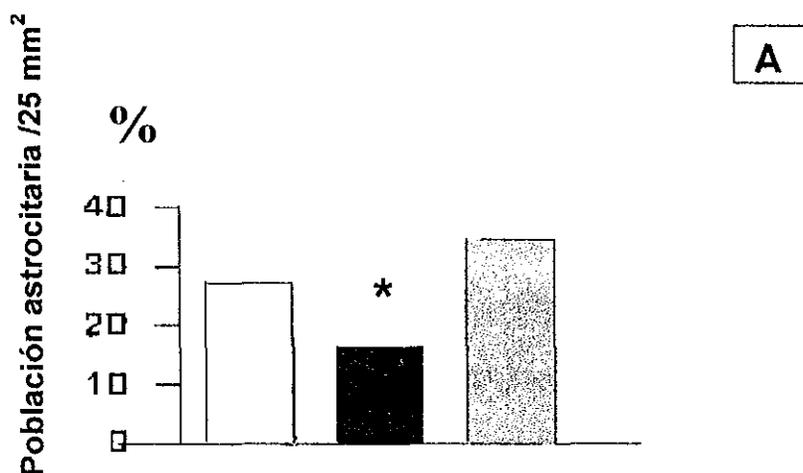
**Figura 17-B.-** Al analizar la transformación del citoplasma astrocitario en el lado ipsilateral a la lesión nerviosa se manifiestan que los neuroesteroides no inhibieron la transformación de los astrocitos.

Anova y Duncan

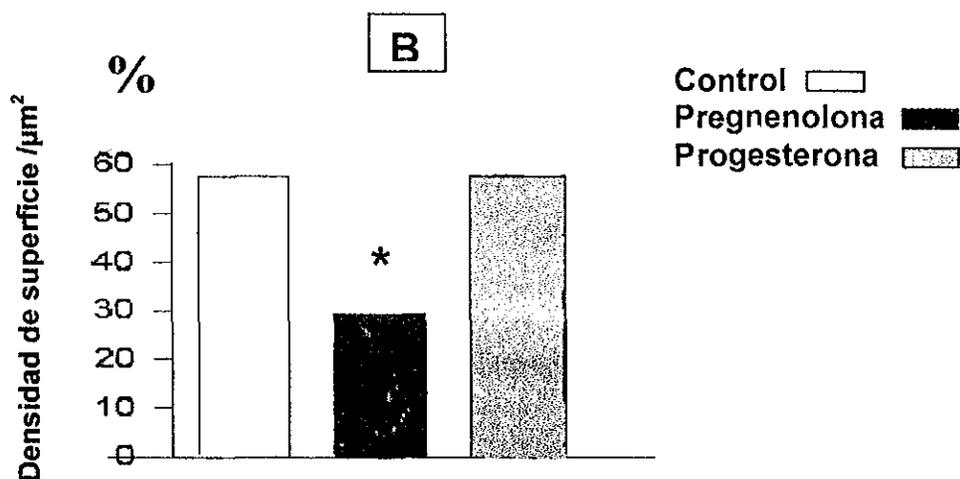
\*Indica diferencias significativas  $p < 0.05$

El valor 0 corresponde al lado contralateral no lesionado

### Análisis de la astrogliosis reactiva 60 días posesión



**Figura 18-A**.- Al analizar los resultados de esta etapa se hace evidente que la pregnenolona disminuyó la población astrocitaria del lado ipsilateral a la lesión nerviosa comparándolo con el control sin tratamiento.



**Figura 18-B**.- Los resultados de la transformación del citoplasma astrocitario se asemejan a los resultados del número de astrocitos de la gráfica anterior, ya que nuevamente la pregnenolona tuvo un mayor efecto inhibiendo la transformación citoplasmática.

Anova y Duncan

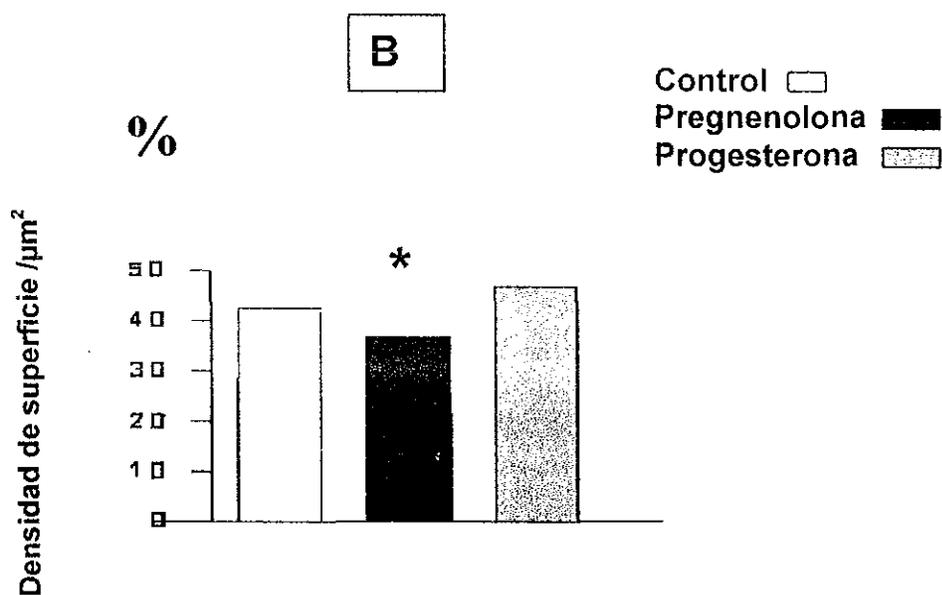
\*Indica diferencias significativas  $p < 0.05$

El valor 0 corresponde al lado contralateral no lesionado

### Análisis de la astrogliosis reactiva 90 días posesión



**Figura 19-A.-** Muestra que se produjo disminución de la población astrocitaria por el efecto del neuroesteroide pregnenolona del lado ipsilataeral a la lesión nerviosa.



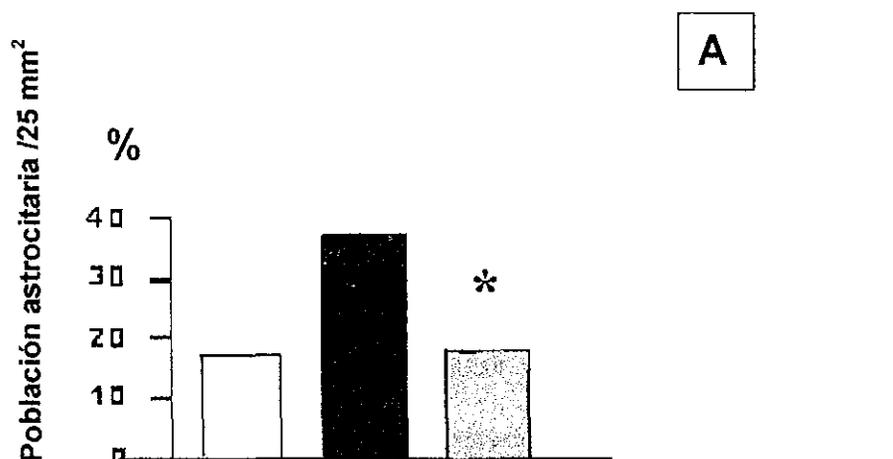
**Figura 19-B.-** Los resultados de la zona medular del lado lesionado muestra que el grupo de pregnenolona provocó una disminución de la densidad de superficie de los astrocitos mayor que en los tejidos controles sin tratamiento de neuroesteroides.

Anova y Duncan

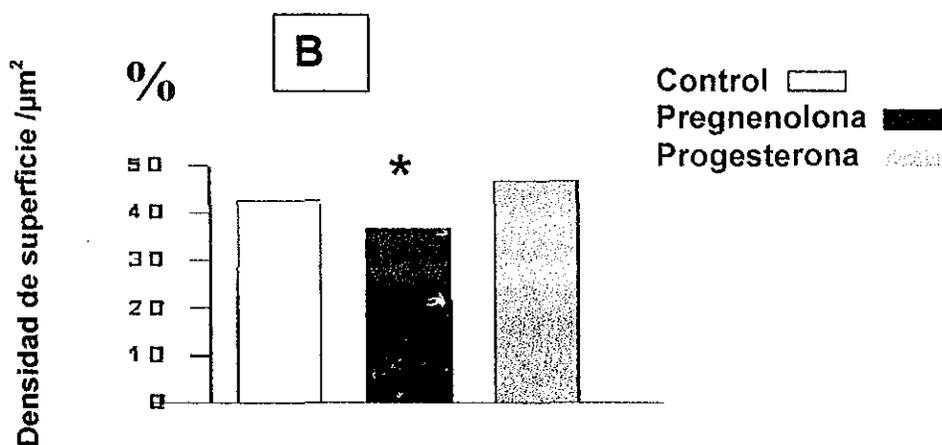
\*Indica diferencias significativas  $p < 0.05$

El valor 0 corresponde al lado contralateral no lesionado

### Análisis de la astrogliosis reactiva de 120 días posesión



**Figura 20-A.-** Muestra el efecto del neuroesteroide progeterona en el séptimo medular del lado lesionado disminuyendo la población astrocitaria.



**Figura 20-B.-** Los tejidos analizados con influencia de progesterona presentaron una menor transformación citoplasmática que los tejidos de pregnenolona y el grupo control sin tratamiento de neuroesteroides, esto demuestra que no mantuvieron un efecto constante durante los 120 días del estudio.

Anova y Duncan

\*Indica diferencias significativas  $p < 0.05$

El valor 0 corresponde al lado contralateral no lesionado.

## Resumen de los resultados graficados para el séptimo segmento medular

Tomando en cuenta que no provocamos una lesión directa en el segmento medular analizado, si no que a través de la lesión en el nervio ciático se espera una respuesta a nivel de las zonas de dominio medular del nervio, y como ya antes se ha explicado con detalle, se espera una muerte neuronal, un aumento de la gliosis reactiva expresada en un incremento del número de astrocitos y la densidad de superficie (transformación del citoplasma astrocitario).

Pero debido a que el daño lo provocamos en el nervio y no de forma directa en la medula, la inmoreactividad es variable en cada una de las etapas analizadas en este trabajo sin embargo, la influencia de los neuroesteroides sí estuvo presente en cada una de ellas como pudimos constatarlo a lo largo del estudio.

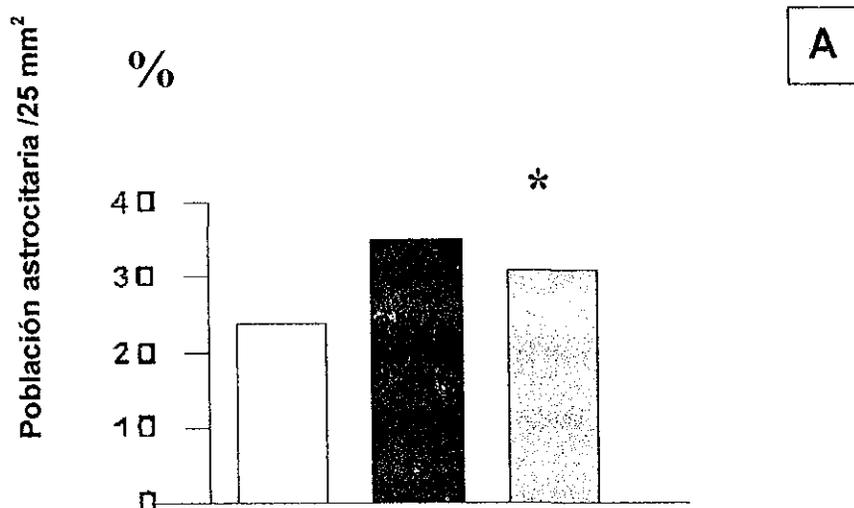
Así pues al analizar el lado ipsilateral a la lesión nerviosa tomando como base el nivel (0) a el lado contralateral de la lesión nerviosa podemos mencionar lo siguiente:

Los tejidos medulares inmunotefidos con GFAP, tanto del grupo control sin tratamiento como de los experimentales con tratamiento de neuroesteroides progesterona o pregnenolona tuvieron efectos variables a lo largo del estudio pero a pesar de esto, en la etapa de 30 días (figura 17-A y B) la pregnenolona provocó disminución de la población astrocitaria e inhibió la transformación citoplasmática de los astrocitos, lo mismo sucedió a los 60 días (figuras 18-A y B) y a los noventa días (Figuras 19-A y B), sin embargo, al llegar el término del estudio la pregnenolona no mantuvo este efecto y, como se observa en la (figura 20-A y B), la progesterona provocó un efecto similar al de la pregnenolona.

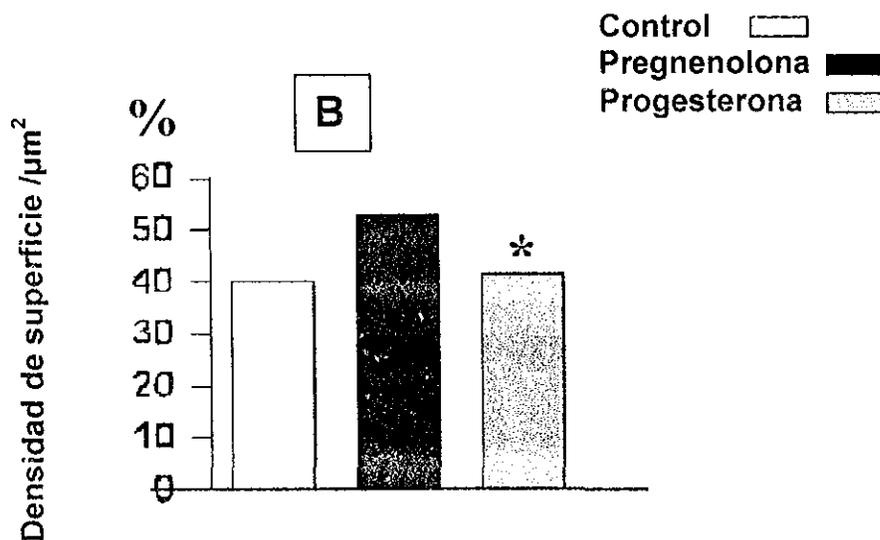
## **Segundo segmento medular sacro**

**Se muestran las gráficas que indican el porcentaje de incremento en el número de astrocitos y la densidad de superficie astrocitaria en comparación con el lado contralateral a la lesión nerviosa en cortes de médula espinal de los tres grupos control y experimentales.**

### Análisis de la astrogliosis reactiva 30 días posesión



**Figura 21-A.-** En esta etapa los cortes medulares inmunoteñidos con GFAP tratados con neuroesteroides no provocaron descenso de la población astrocitaria en el lado ipsilateral a la lesión nerviosa, es decir no tuvieron efecto alguno en los primeros 30 días



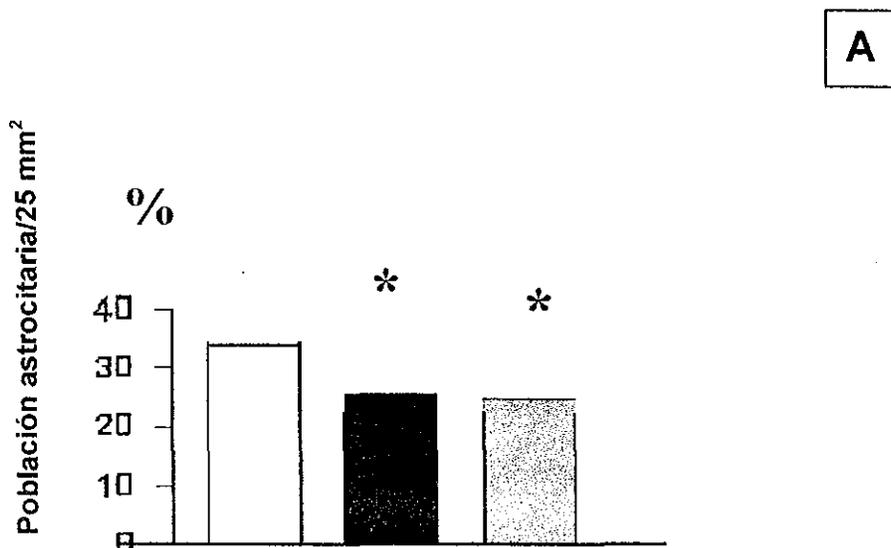
**Figura 21-B.-** Los cortes medulares analizados del lado ipsilateral a la lesión indican que los grupos tratados, la progesterona presentó un mejor efecto, pues inhibió la transformación del citoplasma astrocitario casi a los mismos niveles que el grupo control.

Anova y Duncan

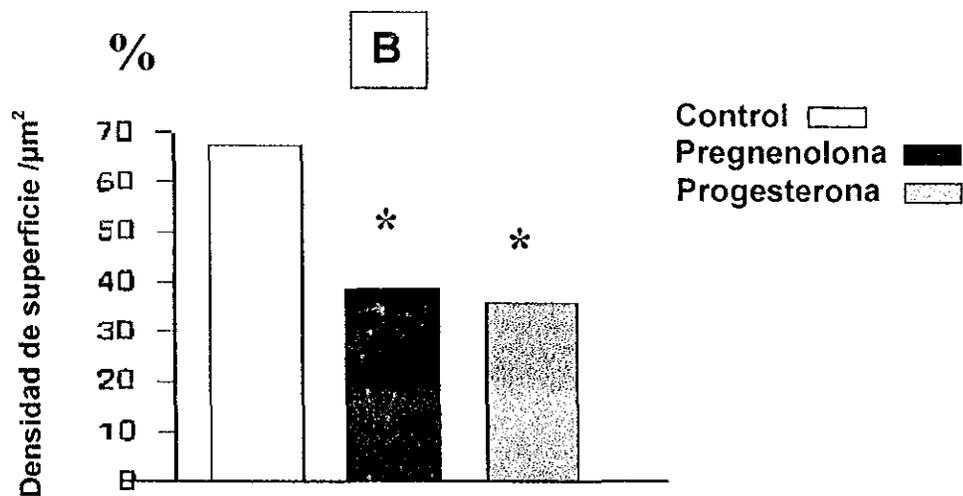
\*Indica diferencias significativas  $p < 0.05$

El valor 0 corresponde al lado contralateral no lesionado.

### Análisis de la astrogliosis reactiva de 60 días posesión



**Figura 22-A.-** en esta etapa del estudio se hizo evidente un descenso de la población astrocitaria inmunoteñida en los cortes medulares tratados con neuroesteroides.



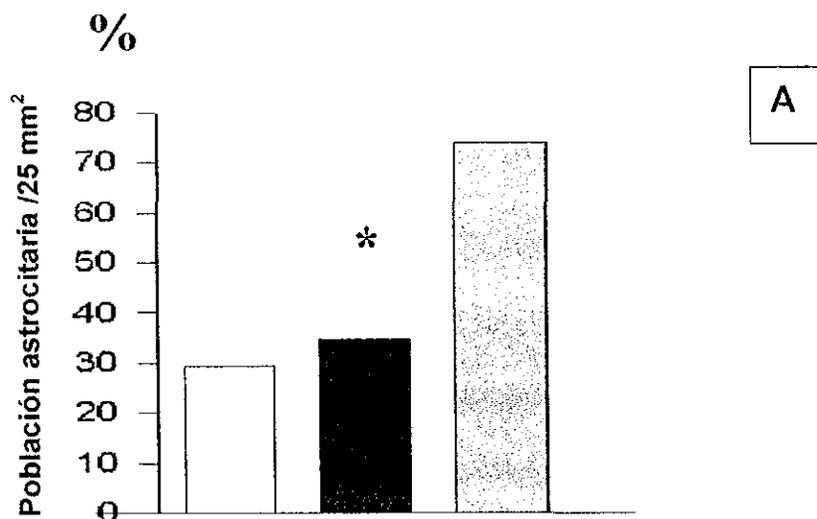
**Figura 22-B.-** Al analizar la transformación del citoplasma astrocitario en el lado medular ipsilateral a la lesión nerviosa se manifiesta un efecto favorable de los neuroesteroides "IN SITU" redujeron el incremento del citoplasma.

Anova y Duncan

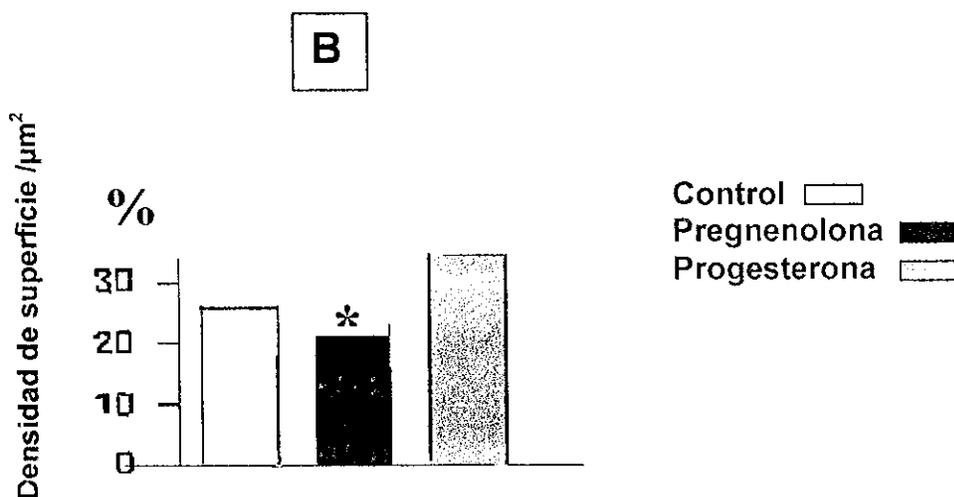
\*Indica diferencias significativas  $p < 0.05$

El valor 0 corresponde al lado contralateral no lesionado.

### Análisis de la astrogliosis reactiva 90 días poslesión



**Figura 23-A.-** En esta etapa nuevamente los efectos de los neuroesteroides varían pues el análisis de los cortes medulares del lado ipsilateral a la lesión indican que la pregnenolona redujo el incremento del número de astrocitos.



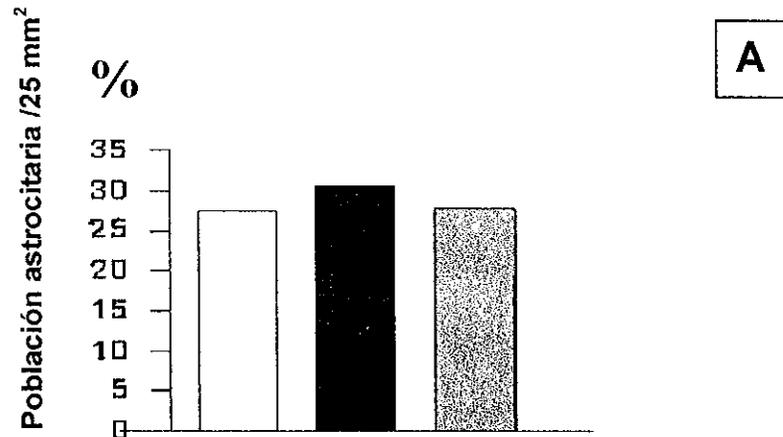
**Figura 23-B.-** El incremento de transformación astrocitaria fue inhibido por el efecto del neuroesteroide pregnenolona en esta etapa presento mejores efectos que el grupo de progesterona en el lado ipsilateral a la lesión del nervio al igual que en la gráfica anterior.

Anova y Duncan

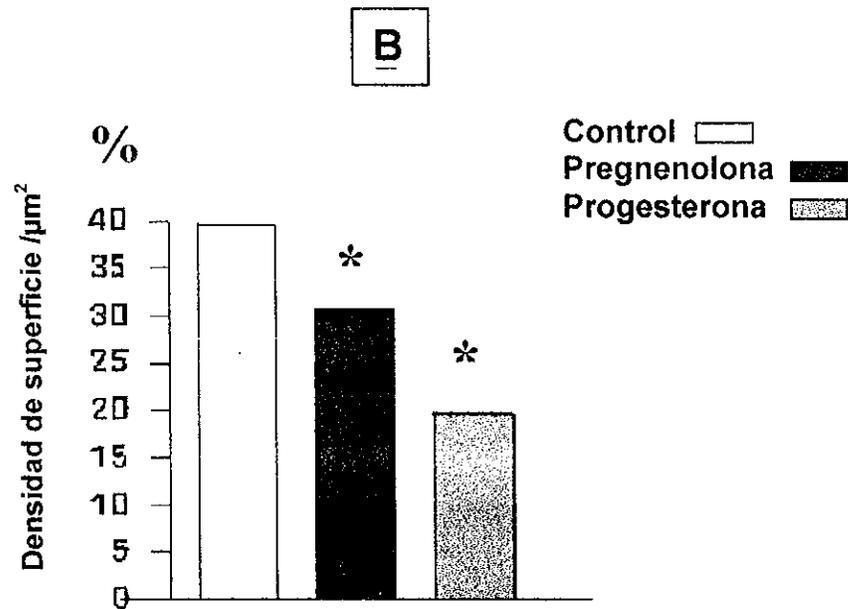
\*Indica diferencias significativas  $p < 0.05$

El valor 0 corresponde al lado contralateral no lesionado.

### Análisis de la astrogliosis de 120 días posesión



**Figura 24-A.-** La gliosis reactiva no fue disminuida por los efectos de los neuroesteroides en el lado medular ipsilateral a la lesión nerviosa.



**Figura 24-B.-** El análisis de los cortes medulares del lado ipsilateral a la lesión muestran resultados que indican que los neuroesteroides, pregnenolona y progesterona, mantuvieron sus efectos hasta los 120 días postlesión ya que redujeron la transformación del citoplasma astrocitario.

Anova y Duncan

\*Indica diferencias significativas  $p < 0.05$

El valor 0 corresponde al lado contralateral no lesionado

### **Resumen de los resultados graficados para el segmento medular sacro dos.**

La presencia de la gliosis reactiva tras una lesión nerviosa es revelada por la proteína acídica fibrilar glial (GFAP) presente en el citoesqueleto de los astrocitos inmureactivos. El análisis que se practico a fue a los tres grupo control y experimentales en segmento medular de dominio del nervio ciático en lado ipsilateral a la lesión nerviosa a través del curso del tiempo programado de 30, 60. 90 Y 120 días poslesión mostró los siguientes resultados:

En la etapa de 30 días poslesión todavía no se hacen evidentes los efectos de los neuroesteroides (figura 21-A y B) razón por lo que se incrementa la densidad de superficie y el número de astrocitos.

Más tarde a los 60 días poslesión ya es evidente el efecto de los neuroesteroides (figura 22-A y B) por lo se observa una disminución del incremento del número de astrocitos en los cortes medulares de tejidos de los grupos pregnenolona y progesterona .

A los 90 días poslesión (figura 23-A y B) se observó en los cortes medulares inmunoteñidos con GFAP que los efectos de los neuroesteroides no se mantenían estables, pues la progesterona disminuyó su efecto en esta etapa, pero, sin embargo, la pregnenolona seguía reduciendo el número de astrocitos y su transformación citoplasmática.

Al finalizar el estudio, los resultados muestran que los neuroesteroides no mantienen estables sus efectos y que se comportan variantes y solo inhiben la transformación del citoplasma astrocitario, mas no el número de astrocitos.

## **Resumen de los resultados del análisis aplicado a los segmentos L7 y S2.**

Al final podemos resumir los resultados de las dos regiones analizadas en los cortes medulares de los lados ipsilaterales a la lesión nerviosa de la manera siguiente:

Hay que tomar en cuenta que el nervio ciático del perro tiene su origen preciso, anatómicamente hablando, en el plexo lumbosacro que esta formado a su vez por decusación de las ramas dorsales de los dos últimos nervios lumbares y las ramas dorsales de los tres primeros sacros de los nervios espinales y, además, de originarse este nervio también tienen su origen otros nervios importantes como el nervio femoral, los obturadores, los pudendos internos y externos por mencionar algunos,

Todos estos nervios junto con el ciático transcurren por la médula, desde la sexta lumbar hasta la sacra dos aproximadamente, lo que nos indica que la médula mantiene bastante afluencia de factores tróficos y de sustancias nutritivas para el metabolismo celular y que de alguna manera influyen en la supervivencia de las estirpes celulares localizadas en esta regiones.

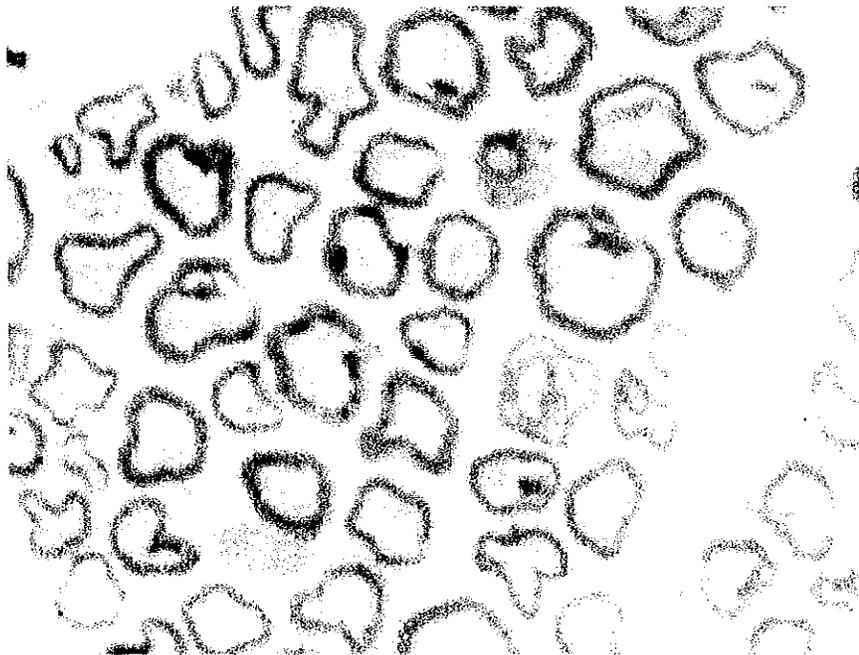
Es por eso que, posiblemente, esto haya tenido que ver con las fluctuaciones de los efectos neuroprotectivos que tuvieron los neuroesteroides en estas dos regiones medulares.

Así pues fue mayor la reactividad astrocitaria expresada en el aumento del número de astrocitos y densidad de superficie del segmento medular sacro dos que del séptimo segmento medular lumbar. Los neuroesteroides, en algunas etapas, redujeron casi a la normalidad la gliosis reactiva, pero variaban constantemente, sin embargo, podemos decir que la hormona base de la pregnenolona, provocó un mejor efecto en las dos regiones a lo largo del estudio aunque también la progesterona presentó efectos benéficos pero en menor nivel.

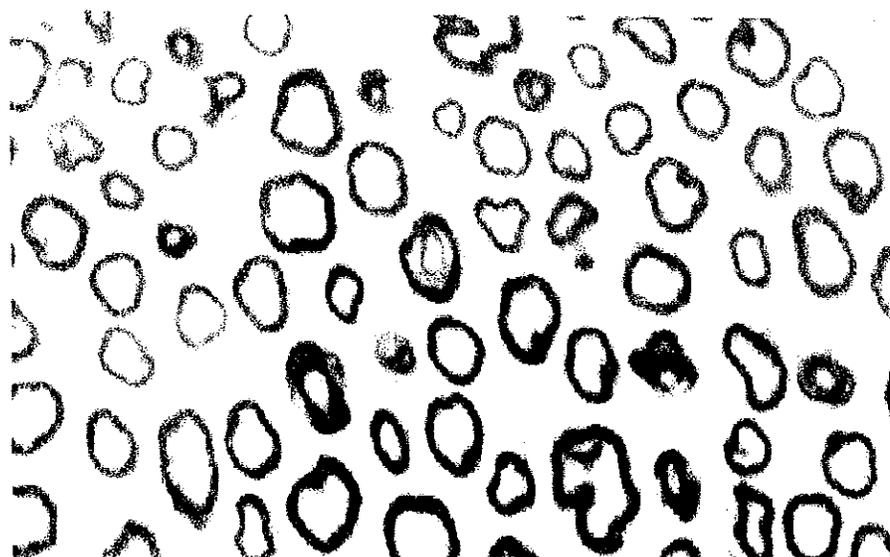
### **Estudio histológico descriptivo del muñón distal.**

Con el propósito de conocer el efecto final de la variación observada del tamaño y el número de astrocitos inmunopositivos a GFAP, como significado de su transformación de su citoplasma a través del curso temporal analizado, decidimos realizar un estudio histológico del arreglo del segmento distal del nervio ciático de perros axotomizados y tubulizados con "quitosana". Este segmento fue seleccionado debido a que es mucho más vulnerable a los cuatro meses de la disección que el segmento proximal; por lo que se hacen manifiestos con mayor severidad los efectos de la prótesis y el tratamiento con progesterona y pregnenolona.

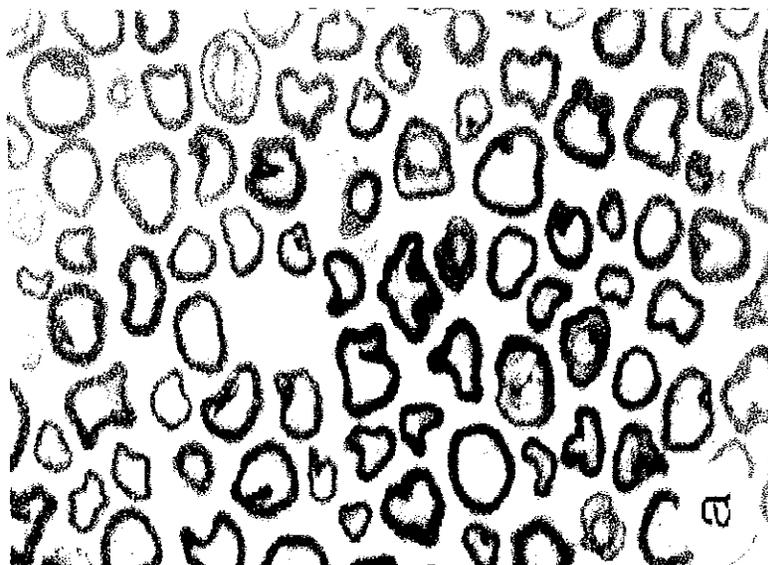
**Cortes transversales del segmento distal del nervio ciático incluidos en resinas epóxicas con tinción de azul de toluidina, espesor de 1µm con microscopía de luz a 100 (X).**



**Figura.- 25** Fotografía de un corte transversal del segmento distal del nervio de un perro control a los 120 días poslesión, pueden observarse axones de diferente tamaño con un espacio intersticial amplio ocupado por elementos de tejido conectivo.



**Figura 26.-** Fotografía un corte transversal del segmento nervioso distal de un perro lesionado por axotomía-tubulización del nervio ciático y tratado con pregnenolona y sacrificado a los 120 días poslesión, en este corte se observan axones de tamaño mas regulares con una mayor organización y mayor espesor de mielina que los del corte anterior.



**Figura 27.-** Fotografía de un corte transversal del segmento distal de un perro tratado con progesterona "IN SITU" y sacrificado a los 120 días después de la axotomía-tubulización se observan axones de gran tamaño y espesor de mielina que demuestra que no degenero el muñón.

## **9. DISCUSIONES.**

### **Elaboración de las prótesis de quitosana y sus propiedades**

A pesar de los estudios previos (Thacharodi, 1995), en donde ya se han incorporado sustancias encubiertas de quitosana con el fin de mantener una liberación prolongada de las mismas el proceso de elaboración de prótesis y la incorporación de neuroesteroides en las paredes de las cámaras de quitosana, no es un procedimiento estandarizado que garantice que las moléculas de los esteroides no se modifiquen por efecto de las sustancias químicas con las que se elaboran las prótesis, Para asegurarnos de esto, será necesario cuantificar niveles sericos de los esteroides implantados a diferente tiempo después del implante, analizar la conformación de la molécula mediante resonancia magnética nuclear en los restos de las cámaras y para confirmar que el procedimiento de incorporación de los esteroides al tubo de quitosana no afectó su estructura química.

Por otro lado, ya que cada una de las cámaras fueron elaboradas con sobreposiciones de 20 capas precipitadas de quitosana líquida, con un grosor aproximado de 1.5 mm de espesor, apoya la propuesta inicial de que este biomaterial es un buen candidato para desarrollar prótesis bioactivas (Muzzarelli, 1994). Pues al final del estudio las paredes eran delgadas y quebradizas y de menores 1 a 0.5 mm de espesor.

### **Evolución quirúrgica**

El perro es una especie evolutivamente más desarrollada que la rata y por esta razón es más sensible a los procesos infecciosos, pero el hecho de que la quitosana sea un biomaterial orgánico y biodegradable (Lee, 1995) favoreció la aceptación por parte del organismo evitando su rechazo, pero no su encapsulamiento con material fibroconectivo.

La herida quirúrgica cicatrizó, aproximadamente, 22 días posesión sin manifestar procesos inflamatorios e infecciones locales o sistémicas.

### **Análisis del contenido de la cámara de crecimiento.**

Todas los tubos de quitosana, en cualquier etapa del estudio microscópicamente, al momento de retirarlas se encontraban cubiertas de un material fibroconectivo y adiposo que se perdía entre los dos muñones sin poder distinguir fibras nerviosas.

Debido a que una de las cámaras del grupo control de 120 días postlesión fue degradada completamente, pues al tratar de extraerla no se localizó y además se observó un desgaste gradual de las paredes de los restos de las cámaras de quitosana, puede indicarnos que este material fue sensible al ataque de lisozimas tisulares y que a través del tiempo terminan por absorberse, lo que demuestra su capacidad para integrarse a los tejidos (Saintign, 1993),

En el interior de las cámaras no se observó una organización que correspondiera a un nervio en etapa de crecimiento como lo menciona Ionen (1987), Ballery (1993) y Varón, (1993), sin embargo, tampoco se observó material purulento ni exudados inflamatorios. La masa tisular presente en el interior de la cámara correspondió a una matriz amorfa con abundantes componentes celulares que no pudieron ser identificados debido a que no se realizó un estudio inmunocitoquímico para caracterizar la estirpe de las células nerviosas y no nerviosas presentes.

La quitosana actuó como un irritante hipoalergénico (Escott, 1994) constante para el tejido nervioso, pues así lo demostró el análisis morfométrico de la gliosis reactiva en las zonas de dominio medular del nervio ciático figuras (17 a la 24), en donde el número de astrocitos y densidad de superficie ocupada por estos se mantuvo elevada en los tres grupos (control y experimentales), ya que en el contenido del interior de los restos de las cámaras de los diferentes tiempos de sacrificio de los animales se encontraron células del sistema inmunológico presentes en irritaciones localizadas.

Se sabe que en procesos inflamatorios crónicos y locales (Usami, 1994) se hacen presentes leucocitos polimorfonucleares, neutrófilos, eritrocitos y macrófagos, pero nosotros no encontramos a estos últimos y los leucocitos observados en el contenido de la cámara no fueron determinantes para desencadenar un proceso inflamatorio crónico durante los 120 días del estudio, debido a que la quitosana, dentro de sus propiedades, es hipoalergénica (Shepherd, 1993) y estimula al sistema inmunológico, pues se ha demostrado que atrae a macrófagos in vitro (Peluso, 1994)

#### **Interpretación del análisis morfométrico de la gliosis reactiva.**

Estudios previos realizados en nuestro laboratorio, se logró regenerar un defecto de 8 mm de longitud del nervio facial de hámsters ( Chavés, 1998) lo que nos demuestra que la distancia es un factor condicionante para que pueda ocurrir crecimiento nervioso. La distancia utilizada de 30 mm rebaso a la capacidad regenerativa del nervio, pensamos que probablemente se pudo mantener la comunicación neuroquímica entre los dos segmentos, lo que facilitó la supervivencia del segmento distal y evitó la muerte neuronal en el dominio medular axotomizado del nervio ciático.

Existen diferentes reportes que confirman los efectos neuroprotectivos y estimulantes de la progesterona (Testas, 1992, 1996) sobre nervios periféricos lesionados en ratones, y de igual manera se ha demostrado que la quitosana, aunada a los efectos sistémicos de la progesterona, ha estimulado la regeneración del nervio ciático de ratas axotomizado y tubulizado con quitosana (Gómez, 1997). Por esta misma razón, podría explicarse el mayor

efecto observado de la pregnenolona, debido a que se encuentra en la etapa directa de síntesis de esteroides a partir de la segmentación de las cadenas laterales del colesterol mediante la enzima p450<sup>cc</sup>, (Baulie y Robel, 1990, 1995) por lo que podría haber originado metabolitos durante su liberación a partir de la malla de colágena, al menos durante las dos primeras semanas postlesión tiempo durante el cual se ha reabsorbido la malla casi completamente, independientemente de los efectos producidos por los esteroides en las paredes.

En diferentes trabajos se ha descrito que los efectos de esteroides son mas importantes dentro de las primeras 12 horas después de una lesión al tejido nervioso, debido al mecanismo de acción de los esteroides que influyen sobre el núcleo celular induciendo la síntesis de proteínas, cuyos productos persisten por tiempo prolongado (Koenig, 1995 y Testas, 1996 ), por esta razón, a pesar de que haya sucedido un estímulo temporal sobre el nervio lesionado por la liberación de esteroides desde la malla, los efectos pudieron manifestarse hasta el momento del sacrificio de los animales.

Otra de las posibles causas de que no se produjera inhibición de astrogliosis en la zona medular de dominio del nervio ciático, puede ser por una dosis insuficiente sin embargo, se ha demostrado que concentraciones elevadas suministradas a través de inyecciones sistémicas tienen efectos menores que la exposición a dosis muy bajas por tiempo prolongado (Testas 1992 ;1996), cómo sucedió en el presente estudio.

Debido a que no se produjo una respuesta uniforme en el segmento medular lesionado por axotomía del nervio ciático y tubulización, es posible que exista una diferente sensibilidad regional en la médula por la presencia de receptores a esteroides (progesterona o pregnenolona), sin embargo, de las diferentes regiones analizadas (L7 y S2) resultó evidente que la pregnenolona produjo los mejores efectos para inhibir la astrogliosis indicativa de una respuesta del tejido nervioso frente a una lesión (figuras 17 a la 24).

No fue posible observar células de microglia en el segmento medular lesionado con la técnica de visualización utilizando Isolectina-B4 que reconoce una glucoproteína presente en la membrana celular de éstas células (Dahl y Bignami, 1973), sin embargo, aplicando un sistema desenmascarante experimental electroquímico (García Estrada, 1996) fue posible identificar astrocitos utilizando Ac dirigidos contra GFAP.

### **Citoarquitectura del muñón distal del nervio seccionado.**

En relación a los muñones distales de los nervios seccionados, cabe mencionar que como se demostró en las figuras 25, 26 y 27, las imágenes de los cortes corónales que se realizaron exactamente en el punto donde se suturaron los muñones distales con los tubos de quitosana 120 días post-axotomía-tubulización, y la intención de llevarlos a microscopía de luz fue con el propósito de comprobar si existía o no muerte del muñón distal (degeneración walleriana), la cual se presenta en los primeros ocho días post-lesión (Waller, 1850) y los cambios degenerativos tardíos del axón sucesivos descritos por Chaundhry (1992) y por Dumitru (1994).

Es por eso que, al no presentarse crecimiento nervioso al interior de la cámara, suponíamos que el muñón tendría una degeneración muy marcada pues por un lado no se presentó crecimiento de axones, y por otro, los neuroesteroides no inhibieron la gliosis reactiva en las zonas medulares de dominio del nervio ciático como se esperaba figuras 9 a la 12. Por lo que la sorpresa fue que los muñones distales de los tres grupos (control y experimentales) mostraban un variado número de axones mielinizados de diferente calibre, lo que deja un serie de suposiciones que actualmente no podemos comprobar y que nos plantearemos como objetivos a resolver en futuros trabajos que, sin duda, alguna, vendrán a despejarnos estas incógnitas que hasta hora dejamos abiertas.

Otra fase de daño tardío, que es provocada por la degeneración del nervio seccionado, son los cambios neuronales retrógrados que suceden en el cuerpo celular en respuesta a la axotomía, en donde se manifiesta una cromatolisis del soma celular (neurona), así como se observa alteración de los cuerpos de Nissl, excentricidad nucleolar vacuolización y muerte celular, descritos anteriormente por Wang (1990)) y Dumitru (1994) lo cual no se observó en los cuerpos neuronales de las regiones medulares de dominio del nervio ciático (figura 8).

Hasta el último periodo estudiado, todavía estaba presente la cámara de crecimiento axónico y no se observó un grado mayor de organización de su contenido, sin embargo, los animales ya habían recuperado su función motora y a la presión demostró, parcialmente, una respuesta sensitiva, por lo que tampoco podemos demostrar si el nervio se recuperó en todas sus funciones.

**Posible explicación de cómo sucedió la recuperación de la pierna lesionada.**

A pesar de que no se produjo regeneración del nervio lesionado al interior de la cámara, como se esperaba, se observó recuperación de la función motora de la pierna lesionada en los animales del grupo control y de los experimentales, aproximadamente a los 20 y 30 días pos- axotomía- tubulización.

Una de las posibles explicaciones para este fenómeno es que haya sucedido una reinervación mediante el crecimiento de fibras nerviosas que nacen del nervio ciático inmediatamente después de que sale del canal medular ya que la axotomía la realizamos a nivel del tercio medio del fémur sin afectar las primeras ramificaciones del nervio, razón por la cual cabe la posibilidad de que estas ramas lograran alcanzar las zonas denervadas por la axotomía o también ramas colaterales que posiblemente se desprendieron del nervio femoral que transcurre en la cara interna del muslo y que finalmente compensaron la pérdida de placas neuromusculares en los sitios diana axotomizados, sin embargo, no se realizaron estudios de potenciales evocados para demostrar la continuidad de impulsos asociada con la intensidad de respuesta entre el segmento proximal del nervio y la zona muscular deaferentada.

Los resultados observados en la figura 6 de los animales que recibieron prótesis con esteroides en sus paredes y en los que adicionalmente se colocó una malla de colágena impregnada con el mismo esteroide para asegurarnos de producir un estímulo local constante (por lo menos durante los primeros estadios postlesión), fueron muy parecidos a los que se observaron en los animales controles, en los que también se colocó la prótesis sin esteroides y que tampoco recibieron esteroides en la malla de colágena.

Por esta razón, resulta evidente que la prótesis por si misma probablemente tuvo efectos facilitadores para la regeneración nerviosa, independientemente de los efectos que pudieron producirse por la presencia de esteroides, y no pudimos confirmar plenamente la hipótesis de que la quitosana es un biomaterial con las cualidades suficientes para utilizarse en la elaboración de prótesis (Yoshimoto, 1995).

## 10. CONCLUSIONES.

- 1.- La tubulización con quitosana del nervio ciático lesionado permitió recuperar la función motora de la pierna a pesar de que no se produjo crecimiento nervioso en el interior de la prótesis.
- 2.- La quitosana fue tolerada y sensible a lisozimas tisulares (absorbible), a los 120 días postlesión se encontraron sus paredes notablemente adelgazadas y en uno de los casos desapareció por completo.
- 3.- No se distinguieron crecimientos nerviosos en ninguna de las cámaras examinadas, ellas contenían una matriz amorfa con una organización estructural mas organizada en función del tiempo poslesión.
- 4.- Los neuroesteroidés estudiados, progesterona y pregnenolona, no inhibieron completamente la astrogliosis medular como ha sido descrito en estudios de lesión cerebral.
- 5.- De los dos neuroesteroides, la pregnenolona produjo la mayor inhibición de la astrogliosis.
- 6.- El segmento nervioso distal examinado reveló una citoarquitectura semejante a la un nervio no lesionado.
- 7.- Finalmente, por los resultados obtenidos en el presente estudio es necesario realizar estudios adicionales para recomendar a la quitosana como prótesis en la tubulización de nervios periféricos.

## 10.- BIBLIOGRAFIA.

- Acikgoz M, Kas HS, Hascelik Z.** Chitosan microspheres of diclofenac sodium,II: In vitro and in vivo evaluation. *Pharmazie*. 1995;50:275-82.
- Aguayo A., David S., Richardson P., Bray G.** Axonal elongation in peripheral and central nervous system transplants. *Advances in cellular neurobiology*. 1982;3:215-34.
- Akwa Y. Schumacher M. Jung-Testas I. Baulieu EE.** Neurosteroids in rat sciatic nerves and Schwann cells. *C.R. Acad. Sci. Paris (Sciences de la Vie)*. 1993a;316:410-414.
- Akwa. Sananes N. Guezou M. Robel P. Baulieu EE. Goascogne L.** Astrocytes and neurosteroids: Metabolism of pregnenolone and dehydroepiandrosterone. Regulation by cell density. *The Journal of cell Biology*. 1993b;121:135-143.
- Aldskogius H., Thomander L.** Selective reinnervation of somatotopically appropriate muscles after facial nerve transection and regeneration in the neonatal rat. *Brain Research*. 1986;375:126-134.
- Baley SB., Eichler ME., Villadiego A., Rich KM.** The influence of fibronectin and laminin during Schwann cell migration and peripheral nerve regeneration through silicon chambers. *Journal of Neurocytology*. 1993;22:176-184.
- Balasingam V. Tejada-Berges T. Wright E. Bouckova R. Yong VW.** Reactive astrogliosis in the neonatal mouse brain and its modulation by cytokines. *J Neurosci*. 1994;14:846-56.
- Barrs DM. MD,FACS.** Facial Nerve Trauma:Optimal timing for repair. *Laryngoscope*. 1991;191:835-848.
- Bates DJ., Ranford JA., Mangelsdorf DC.** Blot and Culture Analysis of Neuronotrophic Factors in Nerve Regeneration chamber Fluids. *Neurochemical Research*. 1991;16:621-628.
- Baulieu EE. Robel P.** Neurosteroids:A new brain function? *J Steroid Biochem Molec Biol*. 1990;37:395-403.
- Baulieu EE.** Steroid hormones in the brain: several mechanisms?. En *Steroid Hormone Regulation of the Brain*. Ed. Fuxé K., Gustafsson JA and Wettenberg L. Pergamon Press, Oxford. 1981;pp 3-14.
- Baulieu EE.** Neurosteroids: a new function in the brain. *Biol. Cell*. 1991;71:3-10.
- Berkenbosch F.** Macrophages and astroglial interactions in repair to brain injury. *Ann N.Y. Acad. Sci*. 1992;650:186-90.
- Beena MS, Chandy T, Sharma CP.** Pheny alanine, tryptophan immobilized chitosan beads as adsorbents for selective removal.

- Berscht PC, Nies B, Liebendorfer A.** Incorporation of basic fibroblast growth factor into methylpyrrolidionone chitosan fleeces and determination of the in vitro release characteristic. *Biomaterials*. 1994;15:593. *mmunoproteins. J Biomater Appl*. 1994;8:385-96 .
- Bignami A, Dahl D.** Astroglial response to stabbing. Immunofluorescence studies with antibodies to the glial fibrillary acidic protein. *Neuropath. Appl. Neurobiol*. 1976;29:99-100.
- Braun RM.** Comparative studies of neuroorrhaphy and sutureless peripheral nerve repair. *Surg Gynecol Obstet*. 1966;122:15-18.
- Bridge PM., Ball DJ., Mackinnon SE., Nakao Y., Brandt K., Hunter DA., Hertl C.** Nerve crush injuries. A model for axonotmesis. *Experimental Neurology*. 1994;127:284-290.
- Brian J.F. MD, Mattox DE., MD.** Experimental nerve regeneration. A review. In: *Otolaryngol Clin North Am*. Department of otolaryngology Head and Neck Surgery. University of California, Irvine. 1991;24:3,739-52.
- Broussignac Patrick** Un haut polymère naturel peu connu dans l'industrie Le Chitosane. ENSCT. Compagnie Rousselot, Paris. Chimie Et Industrie, Genie Chimique; Vol.99 - N° 9 1968 ,
- Budras KD, Frickew, Salazar I.** Sistema nervioso. En: Atlas de Anatomía del Perro. Interamericana Mc Graw-Hill. España, Madrid. 1era Edición, 1989. Pag. VIA.
- Bunge MB., Williams A., Wood PM.** Neuron-Schwann cell interaction in basal lamina formation. *Developmental Biology*. 1982;92:449-60.
- Campbell JB, Bassett CA, Husby J, Thulin CA, Feringa ER.** Microfilter sheaths in peripheral nerve surgery. *J Trauma*. 1961;1:139-157.
- Clemens LG, Weaver DR.** Structure and biosynthesis of gonadal steroids. In "*Handbook of behavioral neurobiology*". Normand Adler, ed, Plenum Press, New York. 1985;7:185-87.
- Chavez E.** Regeneracion del nervio facial del conejo tras axotomia tubulización con silicona y aplicación de neuroesteroides IV Reunion de investigación medica del Instituto mexicano del seguro social de Morelia Michocan México 1998.
- Chaudhry V., Glass JD., Friffin JW.** Wallerian degeneration in peripheral nerve disease. In *Neurologic Clinics. Peripheral Neuropathy: New concepts and treatments*. Vol. 10 Num.3 ,1992.pag.613-627.
- Chen ZW., Wang MS.** Effects of nerve growth factor on crushed sciatic nerve regeneration in rats. *Microsurgery*. 1995;16:547-551.

- Chen YS., Wang-Bennett LT., Coker N.** Facial Nerve regeneration in the silicone chamber: The influence of Nerve Growth Factor. *Exp Neurol.* 1989;103:52-60.
- Chobot-V, Kremenak J, Opletal L.** Phytotherapeutic aspects of diseases of the circulatory system. 4. Chitin and chitosan. *Ceska-Slov-Farm.* 1995;44:190
- Chongliang HE. MS, Zhongwei CH.MD, Zhengrong CH. MD.** Enhancement of motor nerve regeneration by nerve growth factor. *Microsurgery.* 1992;13:151-154.
- Dahl D. Bignami A.** Heterogeneity of the glial fibrillary acidic protein protein in gliosed human brain. *J Neurologi.* 1974;23:551-563.
- Danielsen N.** Nerve regeneration and repair. *Diabetic Medicine.* 1996;13:677-678.
- Davis GE., Varon S., Engvall E., Manthorpe M.** Substratum-binding neurite-promoting factors: relationships to laminin. *Trends in Neurosciences.* 1985;8:528-32.
- Danielsen N. Pettman HL., Vahlsing M., Varon S.** Fibroblast growth factor effects on peripheral nerve regeneration in a silicone chamber model. *Journal of Neuroscience Research.* 1988;20:320-330.
- Delacourte A.** General and dramatic glial reaction in Alzheimer brains. *Neurology.* 1990;40:33-40
- Drozd NN, Sher AI.** The relation between the physicochemical structure and the anticoagulant effect of polysulfated chitosan derivatives. *Eksp Klin Farmakol.* 1994;57:42. 37.
- 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.
- Douglas FR., Ellisman MH.** Axons regenerated through silicone tube splices. I. Conduction Properties. *Exp Neurol.* 1986;92:48-60.
- Douglas R., Ellisman MH.** Axons regenerated through silicone tube splices. *Exp Neurol.* 1986; 43 :61-74.
- Duncan ID., Greveer WE., Chun-Zhang S.,** Repair of myelin disease: strategies and progress in animal models. *Molecular Medicine Today.* 1997;12:554-560.
- Dumitru D. MD.** Reaction of the peripheral nervous system to injury. *In Electrodiagnostic Medicine.* Ed Hanley-Belfus, Inc., Philadelphia. 1994;341.
- Eddleston M. Mucke L.** Molecular profile of reactive astrocytes implications for their role in neurologic disease. *Neuroscience.* 1993;54:15-36.
- Esch F., Baird A., Ling N., Ueno N., Hill G., Denoroy L., Klepper R., Gospodarowicz D., Bohlen P.** Primary structure of bovine pituitary basic fibroblast growth factor (bFgF) and

- comparison with the amino-terminal sequence of bovine brain acidic FGF. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1985;133:554-662.
- Escott GM**, Adams DJ. Chitinase activity in human serum and leukocytes. *Infect Immun*. 1995;63:4770-77.
- Estratton** . Neurofisiología humana 1985, sexta edición.
- Forssman J**. Über die Ursachen welche die Wachstumsrichtung der peripheren Nervenfasern bei der regeneration bestimmen. *Beitrage zur pathologischen anatomie und zur allgeminen Pathologie*. 1989;24:56-100.
- Forssman J**. Zur kenntnis des neurotropismus. *Beitrage zur pathologischen anatomie und zur allgeminen Pathologie*. 1900;27:407-30.
- Ganong WF**. Tejido excitable:Nervio. In: *Fisiología médica*. Ed: Manual Moderno S.A de C.V. México D.F.-Santafé de Bogotá, 16va edición. 1997.pag.57-73.
- Gabrielson GJ, Stenstrom SJ**. A contribution to peripheral nerve suture technique. *Plast Reconstr Surg*. 1996;38:68-72.
- Gomez U**. Regeneración del nervio ciatico de ratas tras axotomia tubulización con quitosana III Reunion de investigación medica del Instituto mexicano del seguro social Aguascalientes Mexico 1997.
- Gutmann E., Holubar J**. The degeneration of peripheral nerve fibers. *J Neurol Neurosurg Psych*. 1950;13:80-105.
- Guénard V., Aebischer P., Bunge RP**. The astrocyte inhibition of peripheral nerve regeneration is reversed by Schwann cells. *Exp Neurol*. 1994;126:44-60.
- Hanson** Regeneration of rat sciatic nerves in silica tubes: characterization of the response to low intensity d.c. stimulation neuroscience vol 58 no. 2 pp 411-421 1994.
- Hann Bonnekoh PG, Scheidt P, Friede RL**. Myelin phagocytosis by peritoneal macrophages in organ cultures of mouse peripheral nerve. A new model for studing myelin phagocytosis in vitro. *J Neuropathol* . 1989;48:140-153.
- Heumann R., Lindholm D., Bandtlow C., Meyer M., Radeke MJ., Misko TP., Shooter E., Thoenen H**. Differential regulation of mRNA encoding nerve growth factor and its receptor in rat sciatic nerve during development, degeneration and regeneration: role of macrophages. *Proceeding of the National Academy of Science (USA)*. 1987;84:8735-9.

- Hentz VR. MD., Rosen JM. MD, Xiao SJ. MD., McGill KC. PhD., Abraham G. MD.** The nerve gap dilemma: A comparison of nerves repaired end to end under tension with nerve graft in a primate model. *The Journal of Hand Surgery*. 1993;18<sup>a</sup>:417-425.
- Hozumi I. CHiu FC. Norton WT.** Biochemical and immunocytochemical changes in glial fibrillary acidic protein after stab wound. *Brain Research*. 1990;524:64-71.
- Hurtado H. Bernard, Van P, Bosch A.** Rat sciatic nerve regeneration in semipermeable artificial tubes. *Exp Neurol*. 1987;97:751-757.
- Ide C.** Peripheral nerve regeneration. *Neurosci Res*. 1996;25:101-21.
- Ide C. Tohyama K., Yokota R., Nitatori T., Onodera S.** Schwann cell basal lamina and nerve regeneration. *Brain Research*. 1983;288:61-75.
- Ide C.** Role of extracellular matrix in the regeneration of a pacinian corpuscle. *Brain Research*. 1987;413:155-169.
- Joseph G chusin m.m.** Neuroanatomia correlativa séptima edición
- Jones KJ.** 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 KJ., Kinderman NB; Oblinger MM.** Alterations in glial fibrillary acidic protein (GFAP) mRNA levels in the hamster facial motor nucleus: effects of axotomy and testosterone. *Neurochemical Research*. 1997;22:11: 1359-66.
- Jung-Testas I. HU ZY. Baulieu EE, Robel P.** Neurosteroids: Biosynthesis of pregnenolone and progesterone in primary cultures of rat glial cells. *Endocrinology*. 1989;125:2083-2091.
- Jung-Testas I. Schumacher M. Robel M. Baulieu EE.** Actions of steroid hormones and growth factors on glial cells of the central and peripheral nervous system. *J Steroid Biochem Molec Biol*. 1994;48:145-154.
- Juurlink BH. Chen Y. Hertz L.** Use of cell cultures to differentiate among effects of various ischemia factors on astrocytic cell volume. *Can J Physiol Pharmacol*. 1992;70:344-349.
- Kabbadj K. El-Etr M. Baulieu EE. Robel P.** Pregnenolone metabolism in rodent embryonic neurons and astrocytes. *Glia*. 1993;7:170-175.
- Kable W., Leonhardt H., Platzer W.** Sistema nervioso y órganos de los sentidos. In *Atlas de Anatomía*. Ed Omega, S.A.-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 Research*. 1988;439:116-121.

- Koenig HL., Schumacher M., Ferzaz B., Do Thi A., Ressouches A., Guennoun R., and et. Al.** Progesterone Synthesis and Myelin Formation by Schwann Cells. *Science*. 1995;268:1500-1503.
- 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.
- Landry CF. Ivy GO. Brown IR.** Developmental expression of glial fibrillary acidic protein mRNA in the rat brain analyzed by in situ hybridization. *J Neurosci Res*. 1990;25:194-203.
- Lawrence RW.** Exogenous fibrin matrix precursors stimulate the temporal progress of nerve regeneration within a silicone chamber. *Neurochemical Research*. 1987;12:851-860.
- Legent., Fleury P., Narcy P., Beauvillain C.** Complicaciones otológicas de los traumatismos craneales y fracturas del peñasco. In: *Manual práctico de ORL*. Ed. Masson editores, S. De R.L. de C.V. México , Impreso en México. 1985. pag. 104-108.
- Levi-Montalcini R.** Developmental Neurobiology and the Natural History of nerve growth factor. *Annu Rev Neurosci*. 1982;5:341-362.
- Lee KY, Ha WS.** Blood compatibility and biodegradability of partially N-acylated chitosan derivatives. *Biomateriales*. 1995;16:1211.
- Lopez A.** Neurofisiología Humana 1987 quinta edición capítulo primero.
- Lipton SA.** Growth factors for neuronal survival and process regeneration. *Arch Neurol*. 1989;46:1241-1248.
- Lindholm D, Heumann R, Meyer M.** Interleukin-1 regulates synthesis of nerve growth factor in non-neuronal cells of rat sciatic nerve. *Nature*. 1987;330:658-659.
- Lundborg G., Bongo FM., Varon S.** Nerve regeneration model and trophic factors in vivo. *Brain Research*. 1982;232:157-161.
- Lundborg G., Rosen B., Abrahamson SO., Dahlin L. Danielsen N.** Tubular repair of the median nerve in the human forearm. *Journal of Hand Surgery (British and European)*. 1994;19B:273-276.
- Mackinnon SE., Dellon AL., Hudson AR.** Chronic nerve compression-an experimental model in the rat. *Ann Plast Surg*. 1984;13:112-120.
- Madison RD., Archibald SJ.** Point sources of Schwann Cells result in growth into a nerve entubulation repair site in the absence of axons: effects of freeze-thawing. *Exp Neurol*. 1994;128:266-275.

- Manthorpe M. Rudge JS. Varon S.** Astroglial cell contributions to neuronal survival and neuritic growth. En *Astrocytes Biochemistry, Physiology and Pharmacology of astrocytes*.
- Machida Y.** Development of topical drug delivery systems utilizing polymeric materials. *Yakugaku-Zasshi* 1993;113:35.
- Marcinkiewicz J, Polewska A.** Immunoadjuvant properties of chitosan. *Arch Immunol Ther Exp Warsz.* 1991;39:127.
- Medinaceli L., Wyatt RJ., Freed W.** Peripheral nerve reconnection: Mechanical, thermal and ionic conditions that promote the return of function. *Exp Neurol.* 1983;81:469-487.
- Muzzarelli RA, Mattioli-Belmonte, Tietz C.,** Stimulatory effect on bone formation exerted by a modified chitosan. *Biomaterials.* 194;15:1075.
- Miledi R, Salter CK.** On the degeneration of rat neuromuscular junctions after nerve section. *J Physiol.* 1970;207:507-528.
- Millaruelo AI., Nieto-Sampedro M., Cotman CW.** Cooperation between nerve growth factor and laminin or fibronectin in promoting sensory neuron survival and neurite outgrowth. *Developmental Brain Research.* 1988;28:219-28.
- Müller H., Lawrence R., Varon S.** Nerve regeneration chamber: evaluation of exogenous agents applied by multiple injections. *Brain Research.* 1987;413:320-326.
- Mucke L. Oldstone MBA. Morris JC. Nerenber MI.** Rapid activation of astrocyte-specific expression of GFAP-lacZ transgene by focal injury. *New Biol.* 1991;3:465-474.
- Navarro X., Verdú E., Butí M.** Comparison of regenerative and reinnervating capabilities of different functional types of nerve fibers. *Exp Neurol.* 1994;129:217-224.
- Netter FH.** Nervios craneales. In *Sistema Nervioso, Anatomía y Fisiología*. Ed. Salvat S.A. Impress. Barcelona. 1987. Pag. 102-104.
- Norton WT. Aquino DA. Hozumi I. Chiu FC. Brosnan CF.** Quantitative aspects of reactive gliosis: a review. *Neurochemical Research.* 1992;17:877-885.
- N. Kalderon** Journal of Neurosciences Research 21:501-512 1988
- Ochca J., Mair WGP.** The normal sural nerve in man. *Acta neuropath (Berl).* 1969;13:197-216.
- Okamoto Y, Shibasaki K, Minami S.** Evaluation of chitin and chitosan on open wound healing in dogs. *J Vet Med Sci.* 1995;57:851.
- Okamura T, Masui T.** Evaluation of effects of chitosan in preventing hemorrhagic cystitis in rats induced by cyclophosphamide. *Hinyokika Kyo.* 1995;41:289.

- Orkand RK.** Role of glial cells in the control of the neuronal microenvironment. En: *Regulatory Mechanisms of neuron to vessel communication in the brain*. New York. Springer-Verlag. 1989; pag.253-270.
- Otterlei M, Varum KM, Ryan L.** Characterization of binding and TNF-alpha-inducing ability of chitosans on monocytes:the involvement of CD14. *Vaccine*. 1994;12:825.
- Paparella-Shumrick.** Neuroanatomía para Otorrinolaringólogos. In: *Otorrinolaringología 1*. Ed. Médica Panamericana. Impres: Argentina. 1982. pag. 147-150.
- Pellegrino RG, Politis MJ., Ritchie JM.** Events in degenerating cat peripheral nerve: Induction of Schwann cell S phase and its relation to nerve fibre degeneration. *J Neurocytol*. 1986;15:17-28.
- Peluso G., Petillo O., Ranieri M., Santin M., Ambrosio L., Calabro D., Avallone B y Balsamo G.** Chitosan-mediated stimulation of macrophage function. *Biomaterials* 1994; 15; 12-15.
- Perry VH., Luner ER, Brown MC.** Evidence that the rate of wallerian degeneration is controlled by a single autosomal dominant gene. *Eur J Neurosci*. 1990; 2:408-413.
- Pham HN, Padilla JA, Nguyen KD, Rosen JM.** Comparison of nerve repair techniques: suture vs avitene-polyglycolic acid tube. *J Reconstr Microsurg*. 1991;7:31-36.
- Puia G. Santi MR. Vicini S. Prichert DB. Purdy RH. Paul SM. Seeburg PH. Costa E.** Neurosteroids act on recombinant Human GABAA receptors. *Neuron*. 1990;4:759-765.
- Rao SB, Sharma CP.** Sterilization of chitosan: implications. *J Biomater Appl*. 1995;10:44-50.
- Ramon y Cajal S.** Experiments dealing with the transplantation of nerves or their products, designed to prove especially an attractive or neurotropic action on nerve sprouts. In *Degeneration and Regeneration of the Nervous System*. Edited and translated by May,R. New York: Hafner Press. 1928; p. 329-61.
- Reier PJ. Houle JD.** The glial scar: Its bearing on axonal elongation and transplantation approaches to CNS repair. En *Functional Recovery in Neurological Disease* (S.G. WAXMAN, ed). *Advances in Neurology*. Raven Press, New York. 1988; pp.87-138.
- Reier PJ. Eng LF. Jakeman L.** Reactive astrocyte and axonal outgrowth in the injured CNS: is gliosis really an impediment to regeneration? En *Neural Regeneration and Transplantation*. Ed Seif FJ. Alan R. Liss, New York. 1989;pp 183-209.
- Rende M., Granato A., Lo Monaco M., Zelano G., Toesca A.** Accuracy of reinnervation by peripheral nerve axons regenerating across a 10 mm gap within an impermeable chamber. *Exp Neurol*. 1991;111:332-339.

- Rich KM., Luszczyński JR., Osborne PA., Johnson EM.** Nerve growth factor protects adult sensory neurons from cell death and atrophy caused by nerve injury. *Journal of Neurocytology*. 1987;16:261-8.
- Richardson M.P.** Neurotrophic factors in regeneration. *Current Opinion in Neurobiol.* 1991;1:401-406.
- Robel P. Baulieu EE.** Neurosteroids. Biosynthesis and Function. *TEM*. 1994;5:1-8.
- 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: Biosynthesis and Function. *Critical Reviews in Neurobiology*. 1995b;9:383-394.
- Sanes JR.** Laminin for axonal guidance? *Nature*. 1985;315:714-15.
- Satoda T., Takahashi O., Tashiro T., Matsuhima R., Uemura-Sumi M., Mizuno N.** Representation of the main branches of the facial nerve within the facial nucleus of the Japanese monkey (*Macaca fuscata*). *Neuroscience Letters*. 1987;78:283-287.
- Salonen V, Peltonen J., Roytta M. Virtanen I.** Laminin in traumatized peripheral nerve: basement membrane changes during degeneration and regeneration. *Journal of Neurocytology*. 1987;16:713-720.
- Saintigny G., Bonnard M., Damour O. y Collombel C.** Reconstruction oepidermis on a chitosan cross-linked collagen-GAG la ofibrobalsts. *Acta Derm. Venereol*. 1990.
- Shepherd, S. Reader , A. Falshaw** Chitosan functional properties, Glycoconjugate Journal, 1993 vol. 14, issue 04, p.p. 535-352
- Seddon HJ.** The use of autogenous grafts for the repair of large gaps in peripheral nerves. *Br J Surg*. 1947;35:151-167.
- Shaw MN., Baker R.** Morphology of motoneurons in a mixed motor pool of the cat facial nucleus that innervate orbicularis oculis and quadratus labii superioris, stained intracellularly with hoseradish peroxidase. *Neuroscience* . 1985;14:627-643.
- Shaw MN., Baker R.** Direct projections from vestibular nuclei to facial nucleus in cats. *Journal of Neurophysiology*. 1983;50:1265-1280.
- Shrikant P. Chung IY. Ballestas ME. Benveniste EN.** Regulation of intercelular adhesion molecule-1 gene expression by tumor necrosis factor –alpha, interleukin-1 beta,and interferon-gamma in astrocytes. *J Neuroimmunol*. 1994;51:209-20.

- Spector JG. MD., Lee P. MD., Derby A., PhD., Friedrich GE., Neises G., Roufa DG. PhD.** Rabbit Facial Nerve regeneration in NGF-containing Silastic Tubes. *Laryngoscope*. 1993;103:548-558.
- Spector JG. MD, Lee P. MD, Peterein J. MS, Roufa D.** Facial nerve regeneration through autologous nerve grafts: A clinical and experimental study. *Laryngoscope*. 1991a;101:537-554.
- Spector GJ. MD, Lee P. MD, Derby A. PhD, Roufa D.** Early stages of facial nerve regeneration through silicone chambers in the rabbit. *Laryngoscope*. 1991b ; 101:1109-1123.
- Spector GJ. MD, Lee P. MD, Derby A. PhD, Friedrich G., Burke JJ. PhD, Vogler PG, PhD.** Facial nerve regeneration through semipermeable chambers in the rabbit. *Laryngoscope*. 1992 ; 102:784-796.
- Spencer PS., Weinberg H., Krygier-Brevart V.** An in vivo method to prepare normal Schwann cells free of axons and myelin. *Brain Res.* 1979;165:119-126.
- Sjöberg J., Kanje M.** Insulin-like growth factor (IGF-1) as a stimulator of regeneration in the freeze-injured rat sciatic nerve. 1989;485:102-108.
- Smith JW.** Microsurgery of peripheral nerves. *Plast Reconstr Surg*. 1964;33:317-329.
- Smith CUM.** Epigenetics of the brain. In: *Elements of Molecular Neurobiology*. Second edition. John Wiley Sons Ltd. Chichester, England. 1996; pp:384-418.
- Snider WD.** Nerve growth factor enhances dendritic arborization of sympathetic ganglion cells in developing mammals. *J Neuroscience*. 1988; 8:2628-2634.
- Soest Jeroen JG** the use of biopolymers in non-food products and applications agrotechnological research institute 1997 Wageningen, The Netherlands
- Stensaas LJ. Partlow LM. Burgess PR. Horch KW.** Inhibition of regeneration: The ultrastructure of reactive astrocytes and abortive axon terminals in the transition zone of the dorsal root. *Prog Brain Res*. 1987;71:457-468.
- Stoll G. Griffin JW. Li CY.** Wallerian degeneration in the peripheral nervous system. Participacion of both Schwann cells and macrophages in myelin degradation. *J Neurocytol*. 1989;18:671-683.
- Terris DJ., Fee WE. MD.** Current issues in nerve reappear. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg*. 1993;119:725-731.
- Topp KS. Fadis BT. Vijayan VK.** Trauma-induced proliferation of astrocytes in the brain of young and aged rats. *Glia*. 1989;2:201-211.

- Trapp BD, Hauer P, Lemke G.** Axonal regulation of myelin protein mRNA levels in **Thacharodi D, Rao-KP.** Development and in vitro evaluation of chitosan based transdermal drug delivery systems for the controlled delivery of propranolol hydrochloride. *Biomaterials.* 1995;16:145.
- actively myelinating Schwann cells. *J Neurosci.* 1988;8:3515-3521.
- Usami Y., Okamoto Y., Minami S., Matsuhashi A., Kumazawa N.H. Tanioka S. y Shigemasa Y.** Migration of canine neutrophils to chitin and chitosan. *J. Vet. Med. Sci.* 1994; 56: 1215-6.
- Varon S., Hagg Theo.** Models to evaluate effects of neurotrophic factors on axonal regeneration: Neurotrophic factors In: *Neuromethods.* Vol: Eds: A. Boulton, G. Bakeer, and F. Hefti. The humana Press Inc. 1993; 25:p. 371-407.
- 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.
- Walz W.** Role of glial cells in the regulation of the brain ion microenvironment. *Prog Neurobiol.* 1989;33:309-333.
- Weiss P.** The technology of nerve regeneration: sutureless tubulation and related methods of nerve repair. *Neurosurgery.* 1944;1:400-450.
- Weinstein DE. Shelanski ML. Liem RK.** Suppression by antisense mRNA demonstrates a requirement for the glial fibrillary acidic protein in the formation of stable astrocytic processes in response to neurons. *J Cell Biol.* 1991;112:1205-1213.
- White FV, Toews AD, Goodrum JF.** Lipid metabolism during early stages of wallerian degeneration in the rat sciatic nerve. *J. Neurochemical.* 1989;52:1085-1092.
- Williams LR., Azzam NA., Zalewski AA., Azzam RN.** Regeneration axons are not required to induce the formation of a Schwann cell cable in a silicone chamber. *Exp Neurol.* 1993;120:49-59.
- Williams LR.** Exogenous fibrin matrix precursors stimulate the temporal progress of nerve regeneration within a silicone chamber. *Neurochemical Research.* 1987;12:851-860
- Williams LR., Longo FM., Powell HC.** Spatial temporal progress of peripheral nerve regeneration in a silicone chamber; parameters for a bioassay. *J Comp Neeurol.* 1983;218:460-470.
- Yu WH.** Administration of testosterone attenuates neuronal loss following axotomy in the brain-stem motor nuclei of female rats. *J Neurosci.* 1989;9:3902-3914.

**Zhong W. MD. Min-Sheng W. MD.** Effects of nerve growth factor on crushed sciotic nerve regeneration in rats. *Microsurgery*. 1995;16:547-551.

**Yoshimoto H, Nagano N, Nishitoba T.** Pharmacological properties of chitosan coated dialdehyde cellulose (chitosan DAC) a newly developed oral adsorbent (I). Effect of chitosan DAC in normal rats. *Nippon Yakurigaku Asshi*. 1995;106:113.