

**Biomembrana de Celulosa Bacteriana y Plasma Rico en Factores de Crecimiento
Derivado de Plaquetas en Neurorrafia: Modelo En Ratas.**

Claudia Fernanda Camacho Paipa

**Trabajo de Grado para Optar al Título de Especialista en Cirugía Plástica: Reconstructiva
y Estética**

Directora:

Dra. Genny L. Meléndez F.

Especialista en Cirugía Plástica Reconstructiva y Estética.

Codirector:

Dr. Juan Carlos Mantilla Reyes.

Especialista en Cirugía Plástica Reconstructiva y Estética

Codirectora:

Dra. Marianny Yajaira Combariza Montañez

Ph.D. En Química

Universidad Industrial de Santander

Facultad de Salud - Escuela de Medicina

Especialidad de Cirugía Plástica: Reconstructiva y Estética

Bucaramanga, 2022

Dedicatoria

El presente trabajo está dedicado a Dios, que me da la fortaleza e iluminación para seguir mis propósitos de vida.

A mis padres quienes me han apoyado en el camino para culminar la especialidad con éxito.

A todos los docentes, que me guiaron durante el proceso de aprendizaje, me aportaron su conocimiento y tiempo para culminar este proyecto de investigación con éxito.

A mis pacientes quienes son el propósito de todo el esfuerzo por aprender lo necesario para atenderlos de la forma más humana, ética y científica posible.

Agradecimiento

A la Universidad Industrial de Santander por ser la entidad que pone a disposición de los estudiantes todo el personal, infraestructura y apoyo, para sacar adelante proyectos académicos de la complejidad como el que se presenta en este manuscrito.

A la directora, Dra. Genny Liliana Meléndez, quien fue mi mentora y mano derecha para poder culminar este proyecto con éxito, sorteando todos los obstáculos presentados durante el tiempo en que se desarrolló la investigación.

A mi codirector, codirectora y asesor epidemiológico quienes dieron los lineamientos para realizar el trabajo con la mayor rigurosidad académica y científica.

A todas personas colaboradoras en el bioterio de la facultad, departamento de patología especialmente al Dr. Julio Cesar Mantilla Hernández y el Dr. Jairo Alfonso Sierra Avendaño, quienes aportaron toda su disposición, tiempo y conocimiento para la lectura y análisis de los resultados.

A los grupos de investigación GIFTEX y CEIAM quienes facilitaron la obtención de la membrana de celulosa bacteriana.

Y finalmente al Dr. Julián Mateo Gelves quien me ayudó y participó en parte del desarrollo de la obtención de los resultados.

Tabla de Contenido

	Pág.
Introducción	13
1. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA Y JUSTIFICACIÓN	15
2. PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN	16
3. HIPÓTESIS INVESTIGATIVA	17
4. OBJETIVOS	18
4.1. <i>General</i>	18
4.2. <i>Específicos</i>	18
5. MARCO TEÓRICO	19
5.1. <i>Regeneración Nerviosa</i>	19
5.1.1. Anatomía.....	19
5.1.2. Degeneración Walleriana.....	20
5.1.3. Regeneración	21
5.2. <i>Clasificación de la Lesión Nerviosa</i>	22
5.2.1. Diagnóstico.....	23
5.3. <i>Tratamiento</i>	25
5.3.1. Reparación Primaria.....	26
5.3.2. Injertos Nerviosos	27
5.3.3. Trasferencia Nerviosa.....	30
5.3.4. Conductos Nerviosos Sintéticos	30
5.4. <i>Aplicaciones Médicas de la Celulosa Bacteriana</i>	32
5.4.1. Celulosa	32
5.4.2. Celulosa Bacteriana	33
5.5. <i>Usos del Plasma Rico en Plaquetas en Lesiones Nerviosas</i>	37

6.	METODOLOGÍA.....	42
6.1.	<i>Diseño del Estudio</i>	42
6.2.	<i>Población de referencia.</i>	42
6.3.	<i>Criterios de inclusión y exclusión</i>	42
6.3.1.	Criterios de inclusión:.....	42
6.3.2.	Criterios de exclusión:.....	43
6.4.	<i>Procedimientos</i>	43
6.4.1.	Producción de la membrana de celulosa bacteriana.	43
6.4.2.	Obtención del plasma rico en factores de crecimiento derivado de plaquetas (PRFC):.....	43
6.4.3.	Procedimiento quirúrgico	44
6.4.4.	Medición Índice de Función del Nervio Ciático	46
6.4.5.	Condiciones de alojamiento de los especímenes.....	48
6.4.6.	Recolección de muestras para estudios de patología	51
6.5.	<i>Variables.</i>	52
6.6.	<i>Tamaño muestral.</i>	54
7.	ASIGNACIÓN DE LAS INTERVENCIONES.	57
8.	PLANEAMIENTO OPERACIONAL	60
9.	ASPECTOS ÉTICOS.....	60
10.	RESULTADOS	61
10.1.	<i>Manejo de Datos y Análisis Estadístico</i>	61
10.2.	<i>Análisis de resultados</i>	62
11.	DISCUSIÓN:.....	77
12.	CONCLUSIONES:.....	83
13.	ALCANCES Y POTENCIALES BENEFICIOS DEL TRABAJO DE GRADO	84
13.1.	<i>Con respecto al desarrollo del trabajo colaborativo:</i>	85
13.2.	<i>Con respecto al desarrollo de tecnologías:</i>	85
13.3.	<i>Dirigidos a la apropiación social y circulación del conocimiento:</i>	85

14. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS87

APÉNDICES..... 97

Lista de Figuras

	Pág.
<i>Figura 1. Fibras Nerviosas Mielínicas y Amielínicas</i>	<i>20</i>
<i>Figura 2. Estructura Anatómica Del Nervio Periférico.....</i>	<i>21</i>
<i>Figura 3. Neurorrafia Epineural.</i>	<i>27</i>
<i>Figura 4. Neurorrafia Perineural.....</i>	<i>28</i>
<i>Figura 5. Neurorrafia Epiperineural.....</i>	<i>28</i>
<i>Figura 6. Injertos interfasciculares.....</i>	<i>31</i>
<i>Figura 7. Estructura molecular de la celulosa.....</i>	<i>33</i>
<i>Figura 8. Estructura de cadenas de celulosa bacteriana producida por dos cepas diferentes de Acetobacter.....</i>	<i>35</i>
<i>Figura 9. Producción de un tubo de CB aplicando la técnica de Roberts.....</i>	<i>37</i>
<i>Figura 10. Tubos de celulosa bacteriana de diferentes diámetros y longitudes.....</i>	<i>38</i>
<i>Figura 11. Aplicación del tubo BASYC® en neurorrafia.....</i>	<i>39</i>
<i>Figura 12. Formación de neuroma.....</i>	<i>39</i>
<i>Figura 13. Proceso de producción de la membrana de celulosa bacteriana.....</i>	<i>44</i>
<i>Figura 14. Apariencia de la membrana de celulosa bacteriana, luego de sacar una muestra de aproximadamente 1 cm².....</i>	<i>45</i>
<i>Figura 15. Proceso de obtención del plasma rico en factores de crecimiento derivado de plaquetas.....</i>	<i>47</i>
<i>Figura 16. Procedimiento quirúrgico, realizado con técnica microquirúrgicas.....</i>	<i>48</i>
<i>Figura 17. Exposición del nervio ciático (NC).</i>	<i>48</i>

<i>Figura 18. Sección del Nervio Ciático.</i>	49
<i>Figura 19. Neurorrafia epiperineural del NC.</i>	49
<i>Figura 20. Nervio ciático envuelto en la membrana de celulosa bacteriana.</i>	50
<i>Figura 21. Registro de las huellas en corredor de marcha.</i>	50
<i>Figura 22. Fórmula para calcular el IFC.</i>	51
<i>Figura 23. Muestra del nervio ciático para estudio histológico.</i>	52
<i>Figura 24. Órganos extraídos durante la necropsia.</i>	53
<i>Figura 25. Flujograma de Intervenciones.</i>	58
<i>Figura 26. Cambios del IFC en el tiempo.</i>	65
<i>Figura 27. Cambios histológicos del nervio ciático de toda la población.</i>	66
<i>Figura 28. Morfología normal del nervio NC, corte longitudinal.</i>	68
<i>Figura 29. Nervio ciático normal, corte transversal</i>	69
<i>Figura 30. Presencia de MCB en rata del grupo 2 (neurorrafia + MCB + PRFC).</i>	70
<i>Figura 31. Anormalidades histológicas en los órganos, tinción realizada con HE.</i>	72
<i>Figura 32. Nervio ciático a nivel de la anastomosis de rata del grupo 2.</i>	73
<i>Figura 33. Acercamiento del nervio ciático a nivel de la anastomosis de rata del grupo 2.</i>	74
<i>Figura 34. Nervio tibial (distal a la anastomosis) de la rata del grupo 2</i>	74
<i>Figura 35. Acercamiento del nervio tibial de la rata del grupo 2.</i>	75
<i>Figura 36. Nervio peroneo de la rata del grupo 2</i>	75

Lista de Tablas

	Pág.
<i>Tabla 1. Clasificación del Grado de Lesión del Nervio Periférico.....</i>	<i>24</i>
<i>Tabla 2. Citoquinas contenidas en los gránulos alfa plaquetarios.....</i>	<i>40</i>
<i>Tabla 3. Tabla Operacional de Variables</i>	<i>55</i>
<i>Tabla 4. Grupos de intervención.</i>	<i>59</i>
<i>Tabla 5. Características biométricas</i>	<i>63</i>
<i>Tabla 6. Índice de función del nervio ciático (IFC).....</i>	<i>64</i>
<i>Tabla 7. Cambios histológicos del nervio ciático al evaluar cada grupo.....</i>	<i>67</i>
<i>Tabla 8. Tabla comparación de complicaciones de los individuos expuestos a MCB con o sin PRFC y no expuestos.....</i>	<i>76</i>
<i>Tabla 9. Tabla comparación de complicaciones de los individuos expuestos a MCB con o sin PRFC y el estándar</i>	<i>76</i>
<i>Tabla 10. Complicaciones.....</i>	<i>77</i>

Lista de apéndices

	Pág.
<i>Apéndice A. Protocolo de condiciones de alojamiento de animales de experimentación en el bioterio.....</i>	97
<i>Apéndice B. Protocolo de preparación de muestras de histología.....</i>	99
<i>Apéndice C. Cronograma de actividades</i>	104
<i>Apéndice D. Presupuesto.....</i>	105

Resumen

Título: Biomembrana de Celulosa Bacteriana y Plasma Rico en Factores de Crecimiento Derivado de Plaquetas en Neurorrafia: Modelo en Ratas*

Autor: Claudia Fernanda Camacho Paipa†

Palabras Clave: Celulosa bacteriana, plasma rico en plaquetas, nervio ciático.

Descripción: Las lesiones de nervio periférico representan un reto clínico y quirúrgico, pues a pesar de manejarlas con el estándar de oro (neurorrafia), aún no se obtienen la recuperación total de los pacientes. Para ello, ahora se estudian los biomateriales asociados a factores de crecimiento.

Objetivo: Analizar el efecto y seguridad de la aplicación de una membrana de celulosa bacteriana (MCB) con y sin plasma rico en factores de crecimiento derivado de plaquetas (PRFC) en neurorrafia del nervio ciático (NC) en ratas.

Materiales y Métodos: Estudio experimental preclínico en 23 ratas Wistar con sección del NC derecho, repartidos en 5 grupos de intervención: *grupo 1*, neurorrafia envuelta en la MCB; *grupo 2*, neurorrafia envuelta en la MCB y PRFC; *grupo 3*, NC envuelto en la MCB, sin neurorrafia; *grupo 4*, reconstrucción con neurorrafia; *grupo 5*, cirugía simulada (CS), sin lesión del NC. Se analizó y comparo la recuperación motora con el Índice de Función del Nervio Ciático (IFC) prequirúrgico, y a los 45, 60 y 90 días postquirúrgicos. Luego se practicó la eutanasia y se hizo el análisis histológico.

Resultados: No se obtuvo ningún caso de mortalidad, pero el 26,09% de las ratas tuvieron complicaciones, siendo más frecuentes en los grupos expuestos ($p = 1.00$). Al día 90, el grupo 2 presentó mejor recuperación motora con una mediana del IFC de -67,534, seguido por el grupo 1 de -85,993, y el III y IV de -93,3, ($p = 0,16$; prueba de Wilcoxon). El 100% de los grupos expuestos tuvo regeneración nerviosa vs el 80% del grupo control.

Conclusiones: Se considera que la aplicación de la MCB con o sin PRFC en la neurorrafia, produce mejor recuperación motora y regeneración nerviosa que el tratamiento estándar para las lesiones nerviosas tipo V de Sunderland. La exposición de las ratas Wistar a la MCB y PRFC no genera casos de mortalidad.

* Trabajo de Grado

† Facultad de Salud. Escuela de Medicina. Especialización en Cirugía Plástica: Reconstructiva y Estética. Director: Dra. Genny Liliana Meléndez. Especialista en Cirugía Plástica Reconstructiva y Estética. Codirectores: Juan Carlos Mantilla Reyes. Especialista en Cirugía Plástica Reconstructiva y Estética. Codirectores y Dra. Marianny Yajaira Combariza Montañez. Ph.D. en Química.

Abstract

Title: Bacterial Cellulose Biomembrane and Platelet Rich Plasma derived Growth Factors in Neurorrhaphy: Model in Rats*

Author: Claudia Fernanda Camacho Paipa†

Keywords: Bacterial cellulose, platelet-rich plasma, sciatic nerve.

Description: Peripheral nerve injuries represent a clinical and surgical challenge, because despite managing them with the gold standard (neurorrhaphy), patients do not get fully recovery of them. For this reason, biomaterials associated with growth factors are now being studied.

Objective: To analyze the effect and safety of the application of a bacterial cellulose membrane (BCM) with and without platelet rich plasma-derived growth factors (PRPGF) in neurorrhaphy of the sciatic nerve (SN) in rats.

Materials and Methods: Preclinical experimental study in 23 Wistar rats with section of the right SN, divided into 5 intervention groups: group 1, neurorrhaphy involved in the BCM; group 2, neurorrhaphy involved in the BCM and PRPGF; group 3, SN involved in the BCM, without neurorrhaphy; group 4, reconstruction with neurorrhaphy; group 5, sham surgery (SS), without SN injury. Motor recovery was analyzed and compared with the Sciatic Nerve Function Index (SFI) before surgery, and at 45, 60 and 90 days post-surgery. Euthanasia was then performed, and histological analysis was done.

Results: No cases of mortality were obtained, but 26.09% of the rats had complications, being more frequent in the exposed groups ($p = 1.00$). At day 90, group 2 presented better motor recovery with a median of SFI of -67.534, followed by group 1 of -85.993, and group III and IV of -93.3, ($p = 0.16$; Wilcoxon test). 100% of the exposed groups had nerve regeneration vs. 80% of the control group.

Conclusions: It is considered that the application of BCM, with or without PRPGF in neurorrhaphy produces better motor recovery and nerve regeneration than the standard treatment for Sunderland type V nerve injuries. The exposure of Wistar rats to BCM and PRPGF does not generate cases of mortality.

* Degree work

† Faculty of Health. Medicine School. Specialization in Plastic Surgery: Reconstructive and Aesthetic. Director: Dr. Genny Liliana Meléndez. Co-directors: Juan Carlos Mantilla Reyes. Specialist in Reconstructive and Aesthetic Plastic Surgery and Dr. Marianny Yajaira Combariza Montañez. Ph.D. in Chemistry.

Introducción

Las lesiones de nervio periférico representan un reto clínico y quirúrgico debido a que, a pesar de los continuos avances en las técnicas de reparación, aún no se obtienen resultados óptimos y no se logra la total recuperación y rehabilitación de los pacientes.

El procedimiento estándar de oro en el manejo de las secciones de nervio periférico es la reparación mediante neurorrafia término-terminal (1,2). Hueter (3) en 1871 describió la neurorrafia término-terminal epineural, sin embargo, esta técnica demostró no ser suficiente para lograr la reparación completa de la lesión.

Langley y Hashimoto(3) desde 1917 propusieron la sutura perineural concepto afianzado con el trabajo de Bora(4) en 1967; quien también estudio el uso de la sutura epiperineural versus las otras dos técnicas (1). Cuando existen brechas nerviosas que no permiten la neurorrafia término-terminal se realiza la interposición de un segmento de nervio autólogo, es decir, un injerto que, para el caso de los humanos, usualmente se trata de un segmento de nervio sural lo cual acarrea una comorbilidad adicional (2). La incidencia de casos de lesiones que no progresan a reinervación completa a pesar de una técnica quirúrgica adecuada, sigue siendo alta (2,5).

Por todo lo anterior, en las últimas décadas se han venido adelantando numerosos estudios para conocer más a fondo la fisiopatología de las lesiones de nervio periférico y el comportamiento de estas después del uso y aplicación de diversas técnicas quirúrgicas y dispositivos (2,6). Tal es el caso de los neurotubos o conductos, que pueden ser sintéticos o naturales, absorbibles o no absorbibles, los cuales se usan para mejorar la neurorrafia termino-terminal y/o para evitar el uso del injerto nervioso, en un intento de reinervación a través del tubo

(2,7,8). Sin embargo, aún se busca el dispositivo ideal que reemplace los injertos autólogos y que mejore la efectividad de las neurorrafia término-terminal.

El uso de biopolímeros para facilitar la regeneración tisular en lesiones de diferentes órganos y tejidos ha tenido auge en las últimas décadas; de estos la celulosa constituye una buena alternativa dado que es la molécula biológica más abundante, ya que su fuente principal es de origen vegetal pues hace parte de la pared celular de las plantas (9,10). La principal ventaja de los compuestos hechos de celulosa es que pueden constituir un andamio que facilita la regeneración de tejidos, pues tienen una gran similitud con la matriz extracelular.

La celulosa puede ser sintetizada por diferentes sistemas biológicos como plantas, hongos y bacterias (10,11). De estas últimas, una de las más estudiadas son las bacterias Gram negativas *Gluconoacetobacter xylinus*(9,10,12). En los trabajos experimentales se ha observado que envolver la neurorrafia con un tubo de celulosa bacteriana derivada de procesos fermentativos realizados por las bacterias *Gluconoacetobacter xylinus* favorece la reducción en la formación de neuromas facilitando los procesos de regeneración nerviosa (13,14).

Si además se emplea plasma rico en plaquetas para propiciar un microambiente favorable a la regeneración tisular, se aprovecha el efecto benéfico de los factores de crecimiento derivados de las plaquetas en la regeneración de los nervios periféricos como lo han demostrado varios estudios en diferentes modelos animales (15–18).

Aprovechando la experiencia de los grupos de investigación GIFTEX y CEIAM de la Universidad Industrial de Santander en el desarrollo de biomateriales, como la celulosa bacteriana (CB), a partir del mucilago de café y de mucilago de cacao (19,20), en este proyecto de investigación se propone el uso de un neurotubo de CB en la reparación de las lesiones nerviosas en ratas Wistar. Para analizar particularmente el efecto de la aplicación de una

biomembrana de CB con y sin plasma rico en factores de crecimiento derivado de plaquetas (PRFC) en neurografía del nervio ciático (NC) en ratas, en un método parecido al propuesto por Kowalska(13) y Sorrenti (18).

1. Planteamiento del Problema y Justificación

Las lesiones de nervio periférico se originan por gran variedad de causas, siendo las de origen traumático una de las más frecuentemente manejadas por el cirujano plástico. Las estadísticas internacionales muestran que un 3% de los pacientes de trauma presenta lesiones de nervio periférico, que afectan con mayor proporción a adultos jóvenes, la mayoría de ellas secundarias a accidentes de tránsito en países desarrollados como Estados Unidos y Canadá, mientras que en otros países son secundarios a lesiones por arma blanca (21,22). Adicionalmente, se ha visto que las lesiones de nervio periférico se presentan con más frecuencia en el miembro superior que en el miembro inferior (21,23), y de las lesiones en el miembro superior los nervios más comúnmente afectados son el nervio radial, seguido por el nervio cubital y nervio mediano (21).

En nuestro medio también vemos reflejadas estas estadísticas de forma similar, donde los pacientes más afectados son los económicamente activos, como consecuencia de trauma, (accidente de trabajo, agresión, accidente de tránsito, etc). Es así como se ha visto que, en el Hospital Universitario de Santander, el compromiso nervioso de la mano traumatizada se presenta en el 16,8% de los pacientes, siendo el nervio colateral radial del índice el más frecuentemente afectado(24).

También se sabe que cuando un paciente requiere reparación quirúrgica de una lesión de nervio periférico, la recuperación funcional no es completa, llegando solo hasta el 80% (22). Inclusive se ha visto en estudios realizados por Mackinnon y Dellon, con datos recopilados por 40 años, que se llega a niveles de recuperación de M4, S3+ (en escalas para medir el grado de funcionalidad motora y sensitiva) en el 20 al 40% de los casos (25).

Así que debemos considerar de gran importancia mejorar los resultados, disminuir las secuelas de las lesiones nerviosas para reincorporar a nuestros pacientes a la vida productiva lo más pronto posible.

Por lo anteriormente mencionado, este trabajo nace de la necesidad de mejorar el resultado de las neurorrafias en procedimientos microquirúrgicos aplicando nuevas tecnologías, como una membrana de CB, asociado a factores de crecimiento contenidos en el plasma rico en plaquetas.

Además, este trabajo permitirá generar nuevos avances científicos, usando tecnologías de bajo costo que utilicen los residuos agroindustriales del cultivo del cacao, producidos en gran cantidad en Santander(19,26), para la producción de la membrana de CB, aprovechando la tecnología desarrollada en nuestra propia universidad.

2. Pregunta de Investigación

¿Cuál es el resultado de la implantación terapéutica de una biomembrana de celulosa bacteriana con y sin plasma rico en factores de crecimiento derivado de plaquetas, en un modelo murino con lesión del nervio ciático manejada con neurorrafia?

3. Hipótesis Investigativa

La implantación terapéutica de una biomembrana de celulosa bacteriana con plasma rico en factores de crecimiento derivados de plaquetas sobre la neurorrafia término-terminal en lesiones del nervio ciático en ratas, favorece una reinervación con un resultado superior en comparación, con una sola intervención terapéutica y aún más superior que la neurorrafia término-terminal de nervio periférico como único manejo.

4. Objetivos

4.1. General

Analizar el efecto y seguridad de la aplicación de una envoltura con biomembrana de celulosa bacteriana con y sin plasma rico en factores de crecimiento en neurorrafia microquirúrgica del nervio ciático en ratas.

4.2. Específicos

- Describir y comparar el efecto sobre la neurorrafia del proceso de cicatrización en los diferentes grupos de estudio.
- Describir y comparar el resultado de la neurorrafia entre los grupos expuestos y el grupo control.
- Evaluar los cambios histológicos producidos por la membrana de celulosa bacteriana al ser usada en un organismo vivo: rata Wistar.
- Evaluar los cambios histológicos producidos por la membrana de celulosa bacteriana asociada al plasma rico de factores de crecimiento en un organismo vivo: Rata Wistar.
- Evaluar los cambios histológicos de la membrana de celulosa bacteriana ante la exposición a plasma rico de factores de crecimiento.
- Evaluar los cambios histológicos de la membrana de celulosa bacteriana al ser usada en un organismo vivo: rata Wistar.

5. Marco Teórico

5.1. Regeneración Nerviosa

Para poder entender cómo se produce el proceso de regeneración nerviosa, hay que conocer primero como es la estructura del nervio y cómo es la fisiopatología en el caso de su lesión.

5.1.1. Anatomía

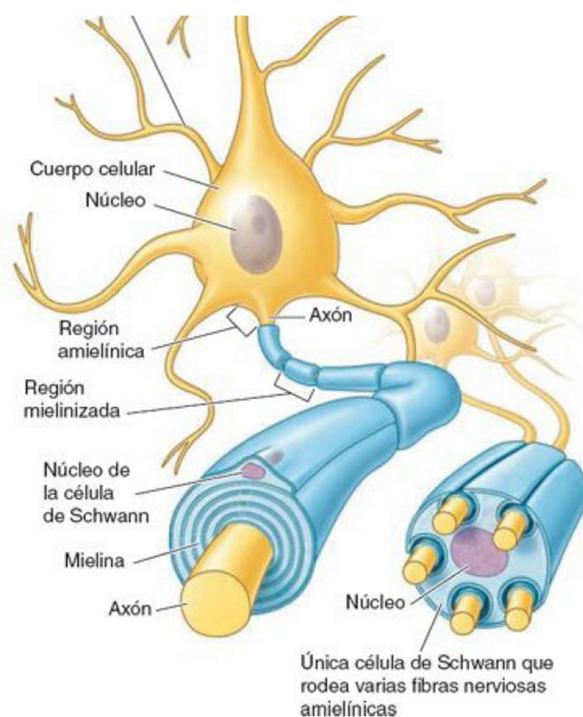
La estructura básica de los nervios es el axón, el cual está cubierto por el neurilema y tejido conectivo circundante. El neurilema es la membrana de una célula Schwann envolviendo un axón (en las fibras mielínicas) o varios axones (en las fibras amielínicas) separándolos entre sí. Las fibras mielínicas tienen una delgada vaina constituida por dos capas, una lipídica y una proteica, llamada mielina, que es producida por las células de Schwann, cuyas funciones principales son permitir una conducción más rápida, del impulso nervioso (**Figura 1.**) (27).

Un nervio se compone de la unión organizada de muchos axones; un axón rodeado de una fina capa de tejido conectivo laxo denominado endoneuro, constituye una *fibra nerviosa individual*; un grupo de fibras individuales están rodeadas a su vez de otra capa de tejido conectivo especializado denominado perineuro constituye un *fascículo*. El perineuro le aporta la mayor parte de la fuerza tensil al nervio. Finalmente, un grupo de fascículos está rodeado por otra capa de tejido conectivo especializado denominado epineuro, que contiene vasos sanguíneos y linfáticos, y su función principal es la nutrición y protección de toda esta estructura denominada *nervio* (¡Error! No se encuentra el origen de la referencia.) (25,27).

5.1.2. Degeneración Walleriana

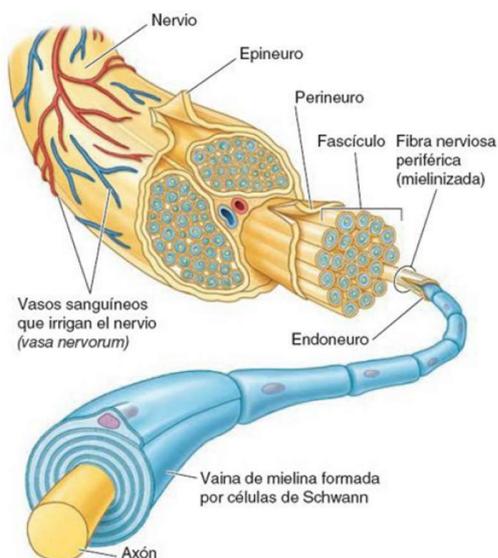
Cuando se presenta una lesión nerviosa, después de las primeras 24 a 48 horas se inicia el proceso descrito por Waller(28) en 1850, conocido como degeneración Walleriana, la cual se produce en forma retrograda hasta el siguiente nódulo de Ranvier y anterógrada (luego de 48 a 96 horas a la lesión) a lo largo del nervio lesionado(3). Al sitio de la lesión migran linfocitos T, neutrófilos y macrófagos; las células de Schwann secretan factor de necrosis tumoral, citocinas inflamatorias e interleucinas que favorecen la degeneración axonal; los macrófagos penetran los tubos formados por las células de Schwann para fagocitar la mielina y los detritus axonales (25,29,30).

Figura 1. *Fibras Nerviosas Mielínicas y Amielínicas*



Nota: Tomado de: Moore, Keith L; et al. (27).

Figura 2. Estructura Anatómica Del Nervio Periférico



Nota: Tomado de Moore, Dailey, & Agur (27).

Se ha visto que cuando un nervio se lesiona y se disrumpe la barrera hemato-nerviosa se genera exposición de proteínas que van a actuar como antígenos ante las células inflamatorias, perpetuando la respuesta inmune y el ciclo de degeneración nerviosa (25).

5.1.3. Regeneración

A los 3 o 4 días de la lesión los axones desaparecen completamente, pero se conserva la membrana basal donde nuevas células de Schwann proliferan alineadas a nivel distal y proximal, formando unos tubos endoneurales que son denominados *cordones de Büngner* que generan el ambiente propicio y constituyen el andamio por donde los axones inician su crecimiento en conos desde el extremo proximal del nervio hasta alcanzar la placa neuromuscular, para el caso de los nervios motores, u órgano blanco para el resto de nervios (25,29,30).

5.2. Clasificación de la Lesión Nerviosa.

Las lesiones nerviosas periféricas han sido clasificadas por diferentes autores. Seddon(31) desde el año 1.942 propuso una, basándose en la anatomía y el tipo de daño funcional que se ocasiona (16,18,32):

- I. *Neuroapraxia*: en la cual no hay interrupción física de ninguna de las estructuras, se considera que hay una lesión fisiológica del nervio por isquemia focal reversible, no hay degeneración Walleriana y los síntomas de la lesión son variables, con una recuperación espontánea más rápida.
- II. *Axonotmesis*: cuando solo los axones son lesionados, pero existe continuidad en el nervio porque las envolturas de tejido conectivo del endoneuro, perineuro y epineuro están conservadas, se presenta degeneración Walleriana distal de los axones, pero como la estructura de soporte permanece se observa una recuperación espontánea de la función a medida que los axones regenerados crecen dentro de ésta.
- III. *Neurotmesis*: es la sección completa del nervio que da como resultado parálisis completa, con atrofia de los músculos inervados por el nervio y pérdida de la sensibilidad en el dermatoma correspondiente.

En 1.951 Sunderland(33) amplió la clasificación y le agregó dos categorías adicionales intermedias entre axonotmesis y neuroapraxia (**Tabla 1**) (21):

- *Lesión grado I*: corresponde a la neuroapraxia en donde los estudios de conducción nerviosa no están alterados distalmente a la lesión y la recuperación completa es espontánea.
- *Lesión grado II*: corresponde a la axonotmesis en donde las capas de endoneuro, perineuro y epineuro están intactas y la recuperación es más lenta que en el grado I.

- *Lesión grado III*: además de lesión del axón hay lesión del endoneuro y por esto se puede retrasar la recuperación por el obstáculo a los axones que provoca el tejido cicatrizal a nivel del endoneuro lesionado.
- *Lesión grado IV*: se lesiona además el perineuro, permaneciendo intacto únicamente el epineuro y aunque hay continuidad nerviosa el tejido cicatrizal no permite la recuperación sin intervención quirúrgica.
- *Lesión grado V*: corresponde a la neurotmesis, con lesión del epineuro y requiere de corrección quirúrgica.

Finalmente, en 1989 S.E. Mackinnon(34) describió la *Lesión grado VI* que es la lesión combinada de los grados I al V de Sunderland en el mismo nervio, la cual es mucho más difícil de diagnosticar y por tanto de definir su tratamiento (21).

5.2.1. Diagnóstico

Para la reparación nerviosa se debe tener en cuenta un adecuado diagnóstico basado en la historia clínica y un examen neurológico completo. El mecanismo del trauma también es un elemento clave para determinar el grado de lesión y la conducta a seguir (21):

- Trauma abierto: de acuerdo con la ubicación anatómica, se debe pensar en una posible lesión grado IV al VI, para lo cual se debe proceder a la exploración quirúrgica.
- Trauma cerrado: se debe hacer seguimiento de la progresión de la lesión y recuperación, tanto en forma electrodiagnóstica, como clínica, por ejemplo, mediante la búsqueda del signo de Tinnel y su progresión de acuerdo con la velocidad estimada de regeneración nerviosa de 1 - 2 mm por día. Si esta no progresa (luego de tres meses) o se detiene considerar la necesidad de la exploración quirúrgica.

Tabla 1. Clasificación del Grado de Lesión del Nervio Periférico

Seddon	Sunderland	Estructura lesionada	Clínica	Afectación nerviosa	Recuperación
Neuropraxia	I	Mielina	Desmielinización segmentaria	Motora > sensitiva	+ (semanas)
Axonotmesis	II	Axón	Axón lesionado	Completa	+ (meses)
	III	Endoneuro	Patrón mixto: Axonotmesis/ neurotmesis	Completa	+/- desorganizada
	IV	Perineuro	Neurona en continuidad	Completa	-
Neurotmesis	V	Epineuro	Sección del tronco nervioso	Completa	-
No aplica	VI	Combinado del grado I al V		Variable	Parcial (solo áreas grado I a III)

Nota: la clasificación de Sunderland(33) es de grado I al V. El grado VI fue propuesto por Mackinnon(34).

Para la exploración clínica se debe conocer el trayecto anatómico del nervio, el tipo de nervio y su territorio de distribución, para explorar la respuesta motora, tono muscular, la sensibilidad, los reflejos y las alteraciones vegetativa en cada nivel; haciendo una evaluación comparativa con el lado contralateral (21).

Los estudios electrodiagnósticos como la velocidad de conducción nerviosa (VCN) y la electromiografía (EMG), son importantes porque ayudan objetivar el diagnóstico, diferenciando

la neuropraxia de la neurotmesis y la axonotmesis, además de identificar nivel de la lesión y para hacer seguimiento determinando si hay recuperación o no(21).

El examen electromiográfico mide la actividad espontánea de la fibra muscular y las características del potencial de acción de la unidad motora. La EMG es normal inmediatamente después de la lesión en el caso de neuroapraxia. En el caso de en axonotmesis o en neurotmesis se observan ondas agudas positivas y potenciales de fibrilación. La EMG se hace anormal varias semanas luego de la lesión, cuando las fibrilaciones aparecen (21).

El estudio de VCN mide la velocidad de propagación del potencial de acción a lo largo del nervio. La VCN es normal en las primeras 48 a 72 horas, al avanzar la degeneración Walleriana a partir del tercer día hay respuesta más lenta o ausente en el caso axonotmesis y neurotmesis, pero puede ser conservada si es una neuroapraxia (21).

5.3. Tratamiento

La decisión quirúrgica puede tener 2 propósitos, la exploración para hacer diagnóstico o con fines terapéuticos (21).

Para el tratamiento en el caso de trauma abierto se deben seguir los principios generales del manejo de las heridas, con lavado, desbridamiento, eliminación de cuerpos extraños, estabilización ósea, reparación de las lesiones vasculares. Y sí se tiene una herida limpia, reciente, con un paciente estable, se cuenta con los equipos necesarios y el personal entrenado se puede hacer la reparación primaria del nervio (2).

Si las condiciones no son adecuadas se puede realizar una reparación secundaria entre 3 a 7 días después, cuando se tenga tranquilidad de que no hay un proceso infeccioso asociado (2).

Si se presenta una pérdida de tejido y las condiciones no son ideales se deben identificar los cabos proximal y distal del nervio, marcarlos con suturas y fijarlos a los tejidos blandos para evitar la retracción y luego programar una reparación diferida (2).

Cuando se realiza la coaptación de los cabos de los nervios se siguen los principios descritos por Millesi(35) desde 1.973, en donde realizar la sutura sin tensión es una meta, para alcanzar esto es necesario realizar una exposición quirúrgica amplia, movilizar o trasponer los nervios lesionados, inmovilizar la extremidad, flexión la articulación adyacente a la lesión y en algunos casos realizar acortamiento óseo (36).

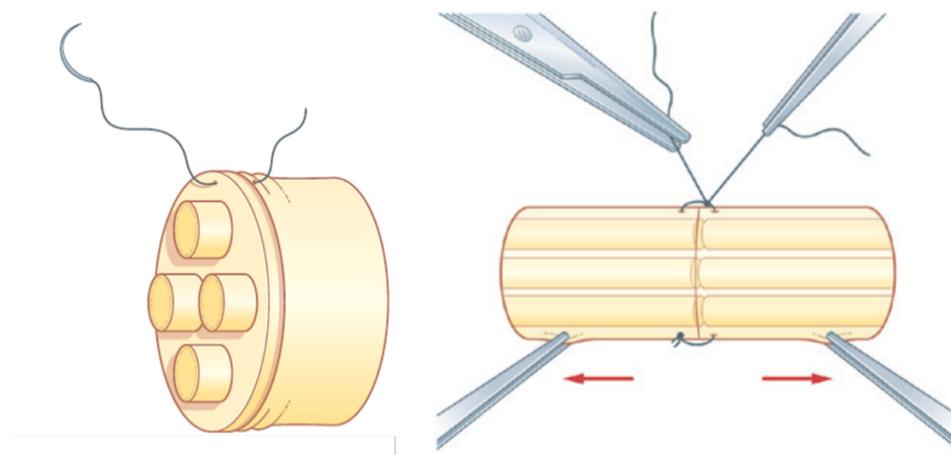
5.3.1. Reparación Primaria.

La sutura se debe realizar con la extremidad en extensión para estar seguros del grado de tensión, en el caso de la sutura término-terminal existen tres técnicas:

- **Neurorrafia epineural:** se considera la opción ideal en los nervios oligofasciculares o monofasciculares, se realiza con suturas de calibre 9-0 que toleran adecuadamente la tensión, hay que calcular la tensión del anudamiento para evitar perder la alineación de los fascículos, con adecuada magnificación el cirujano debe asegurar que no exista rotación de los cabos guiándose por la orientación vascular de la red epineural **(Figura 3)** (37).
- **Neurorrafia perineural:** se realiza la sutura de los fascículos, los cuales se deben identificar y liberar para suturarlos con nylon de calibre 10-0, estas suturas pueden generar tejido cicatrizal que obstruye la regeneración axonal; se debe acompañar de la sutura epineural **(Figura 4)** (36).
- **Neurorrafia epiperineural:** con la se sutura se toma el epineuro y perineuro en un solo paso, asegurándose una alineación más adecuada de los fascículos, se debe hacer de

forma circunferencial para no perder la visualización del resto de fascículos, es la técnica aceptada para los nervios polifasciculares (más de 3 fascículos) (**Figura 5**) (37).

Figura 3. *Neurorrafia Epineural.*



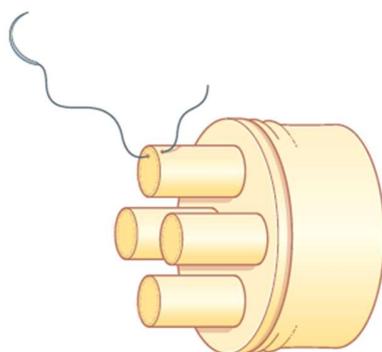
Nota: Tomado de Doi & Warwick (37).

5.3.2. *Injertos Nerviosos*

Cuando existe una brecha entre los cabos del nervio de más de 2 centímetros y no se puede quitar tensión por medio de la transposición nerviosa, flexión articular o acortamiento óseo, se debe considerar el uso de injertos nerviosos. Se prefieren los autólogos, que se consideran como el patrón oro de la reparación nerviosa cuando no es posible la neurorrafia primaria sin tensión (25,36,37).

El nervio que más se usa es el sural por su facilidad de obtención y la baja morbilidad que se ocasiona, existen otras alternativas, como usar los nervios peroneos, intercostales y los nervios cutáneos antebraquial medial y lateral (2).

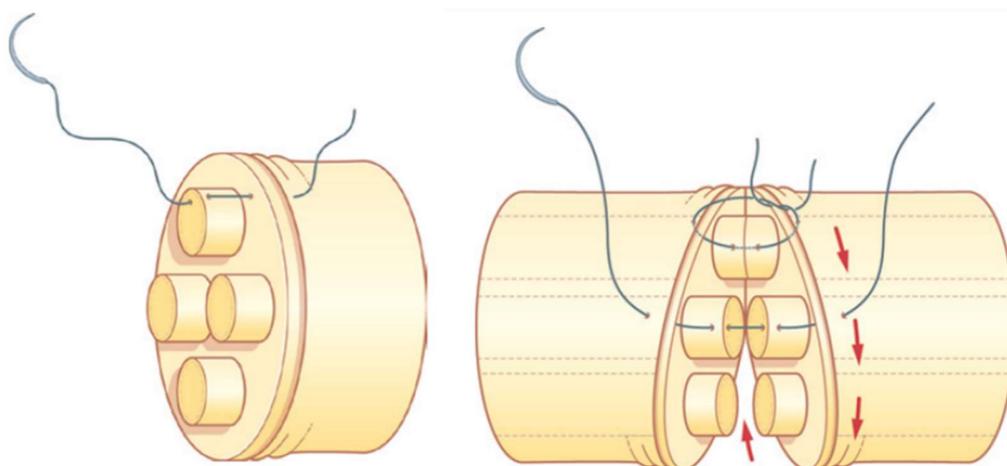
Figura 4. Neurorrafia Perineural



Nota: Tomado de Doi & Warwick (37).

También, se usan a veces para reparación secundaria cuando no hay signos de recuperación de una lesión 2 o 3 meses después de la reparación primaria, en estos casos se reseca una porción del nervio reparado a lado y lado de la sutura en una longitud de 4 centímetros y se interpone el injerto nervioso para garantizar una sutura libre de tensión que sobrepase el área de la lesión (36).

Figura 5. Neurorrafia Epiperineural



Nota: Tomado de Doi & Warwick (37).

Hay dos tipos de injertos autólogos, los frescos; tomados en el mismo acto quirúrgico e injertos predegenerados; los cuales se cortan y se dejan in situ por 2 a 4 semanas, al cabo de los cuales se cosechan y se realiza la neurorrafia, se considera que las ventajas de usar esta opción son (36):

- Se ha completado la degeneración Walleriana en el segmento a injertar lo cual facilitaría el crecimiento de los nuevos axones a través del tubo.
- El nervio es más sólido y fácil de manejar.
- Las células de Schwann están en su pico de actividad que se presenta a los 15-25 días de la sección.
- Se tolera mejor la desvascularización del nervio.

Los injertos nerviosos se pueden usar en un único tubo cuando el calibre es similar con el nervio reparado, en caso de nervios de gran calibre es necesario realizar injertos interfasciculares. En este caso se deben preparar los cabos del nervio receptor resecaando 1 a 2 cm del epineuro y el mesoneuro. Luego se realiza la sutura perineural con nylon 10-0, fascículo por fascículo, siendo más recomendable iniciar por los fascículos más posteriores para facilitar el procedimiento (**Figura 6**) (37).

Existen otras opciones de injertos, los injertos vascularizados y los aloinjertos (2,36,37):

- Injertos vascularizados: se ha considerado que facilitan la regeneración axonal por su mejor vascularización, los más usados son el radial superficial vascularizado y el femorocutáneo superficial, se usan en casos seleccionados por la complejidad en su realización y no existir evidencia clara de su ventaja sobre los resultados funcionales de los injertos no vascularizados (2,36).

- **Aloinjerto:** es de uso limitado ya que requieren de inmunosupresión del paciente hasta por 18 meses que es el tiempo estimado para que los axones y células de Schwann del propio paciente hayan crecido a través del injerto (2). Sin embargo, se han venido aplicando técnicas para disminuir su inmunogenicidad, como la irradiación o la preservación en frío por 4 semanas. Son una buena alternativa en el caso de tener múltiples lesiones nerviosas, donde no se cuente con suficientes áreas donantes (2,38).

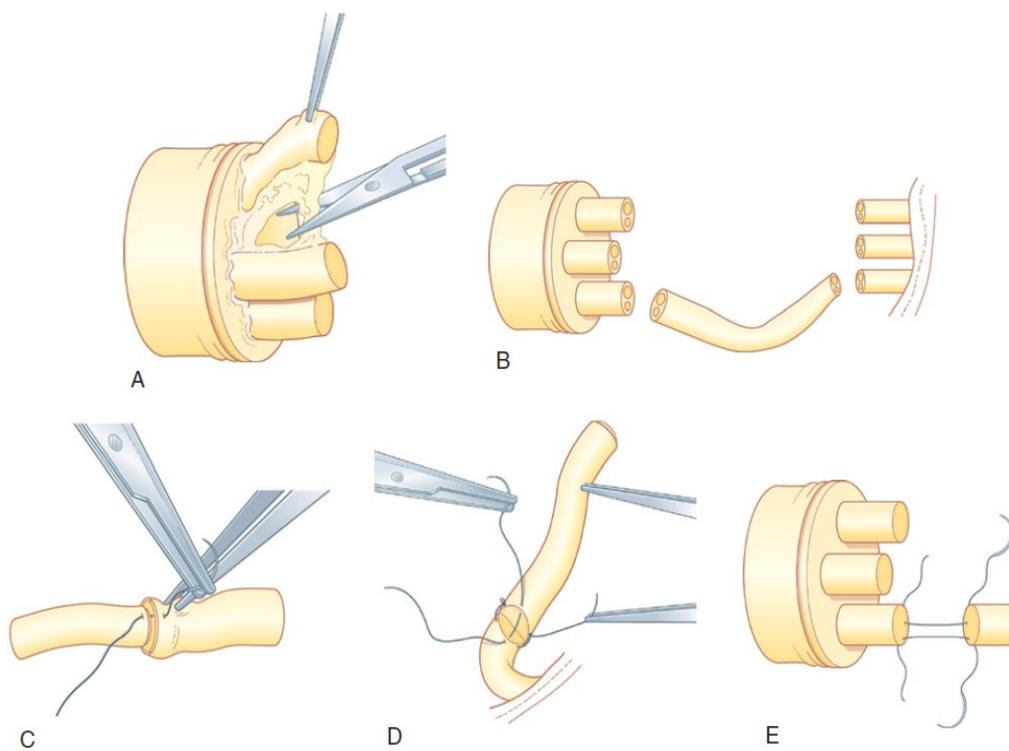
5.3.3. *Trasferencia Nerviosa*

Es otra técnica de reparación nerviosa, donde se toman fascículos de un nervio donante y se transponen al nervio lesionado, con el propósito de neurotizarlo o reinervarlo. Está indicada en lesiones proximales, cuando no hay suficiente tiempo para que el nervio lesionado logre su recuperación hasta el órgano blanco, por la distancia entre los dos; o es difícil explorar la zona donde está la lesión nerviosa para repararla, por la cicatrización (2,37).

5.3.4. *Conductos Nerviosos Sintéticos*

Debido a la limitada disposición de nervios donantes y para evitar las secuelas de su uso, se han desarrollado conductos sintéticos de diferentes biomateriales, los cuales han sustituido los materiales autólogos (tales como puentes arteriales, venosos o de músculo) que se han usado como tubos (2,7,39); y a los conductos de materiales no absorbibles como los de silicona y Gore-Tex®, ya que no han ofrecido un resultado satisfactorio. Estos conductos sintéticos son utilizados para puentear defectos de hasta 3 centímetros de longitud (2).

Figura 6. Injertos interfasciculares



(A) Preparación del nervio receptor. (B) Ubicación del fascículo nervioso. (C) Sutura perineural de la cara anterior del fascículo. (D). Sutura perineural del fascículo. (E) Técnica de sutura de los fascículos posteriores. Nota: Tomado de Doi & Warwick (33).

Algunos de los aprobados por la FDA son (2):

- Tubos de colágeno tipo I bovino, se degradan entre 1-9 meses, sirven como andamio para permitir el paso de los axones regenerados a través de la brecha, se comercializan como NeuraGen® y NeuroMatrix® en España(2).
- Tubos de ácido poliglicólico que también son reabsorbidos y se comercializan como NeuroTube®(2).
- Tubos de Poli-DL-Láctico-Caprolactona comercializados como NeuroLac® (2).

Se han realizados estudios comparando los injertos autólogos, como tratamiento patrón de oro, con neurotubos de diferentes materiales. En el estudio realizado en ratas de 11 meses de edad (adulta mayor), por Clavijo, et al(7); se vio que cuando se usaba el NeuroTube® se promovía un mayor grado de mielinización en comparación a los tubos hechos con policaprolactone ($p < 0.001$) (7). Sin tener diferencias significativas en cuando a la recuperación en pruebas funcionales, cuando se comparaban esos conductos con los autoinjertos (7).

Parte del objetivo de utilizar neuroconductos, no solo es puentear perdida de sustancia, si no también aislar la neurorrafia y promover un ambiente enriquecido para que la reinervación se genere antes que el proceso inflamatorio local interfiera en el crecimiento del cono axonal (11).

En un intento de mejorar el resultado de la regeneración nerviosa se han adicionado a los tubos reabsorbibles factores de crecimiento, observándose cuando se usaron con hidrogel que contenía factor de crecimiento de fibroblastos (BFGF) un incremento en la regeneración axonal (40).

Ya se han sintetizado otros neurotubos de otros biomateriales como la celulosa bacteriana, por ejemplo; el patentado como BASYC - tube ® y empleado en el estudio realizado por Klemm, et al (11).

5.4. Aplicaciones Médicas de la Celulosa Bacteriana

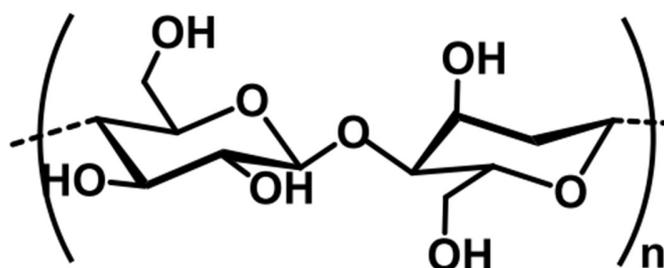
5.4.1. Celulosa

La celulosa está presente en la naturaleza en los vegetales como un polisacárido que está en la pared celular vegetal y en diferentes porcentajes en otros elementos de las plantas. Se considera la biomolécula orgánica más abundante en el planeta (20,32). Desde el punto de vista químico, es un biopolímero compuesto por una cadena de β -(1-4) D-glucopiranososa unida por

enlaces β -1,4-O-glucosídicos (20). La fórmula molecular del polímero, $(C_6H_{10}O_5)_n$, fue descrita por Payen en 1838. (Figura 7)(41).

La celulosa puede ser sintetizada por diferentes sistemas biológicos como plantas, hongos y bacterias(11,20). Por lo tanto, la celulosa de origen vegetal no es la única forma de celulosa que se puede encontrar en la naturaleza, ya que también existe la celulosa bacteriana; esta última se diferencia de la celulosa vegetal por su grado de pureza, cristalinidad (20,32) y porque no se sintetiza asociada a lignina, ni hemicelulosa(32).

Figura 7. Estructura molecular de la celulosa



Tomado de: Flórez, I; Combariza, M, Blanco, M (20) .

5.4.2. Celulosa Bacteriana

La celulosa bacteriana (CB) es uno de los tipos de celulosa más usado en experimentación, por sus aplicaciones en la industria y en productos biomédicos. Una de las bacterias más eficientes en la producción de CB son las bacterias Gram negativas del género *Acetobacter*, particularmente la cepa *Gluconacetobacter xylinus* (42).

La biosíntesis de CB por las bacterias *Gluconacetobacter* implica un proceso complejo con las siguientes etapas (42):

- Polimerización de residuos simples de glucosa en cadenas lineales de β -1,4glucano por acción del sistema macromolecular de la celulosa sintasa.
- Secreción extracelular de las cadenas de glucano.
- Ensamblaje y cristalización de las cadenas de glucano en cintas arregladas jerárquicamente.

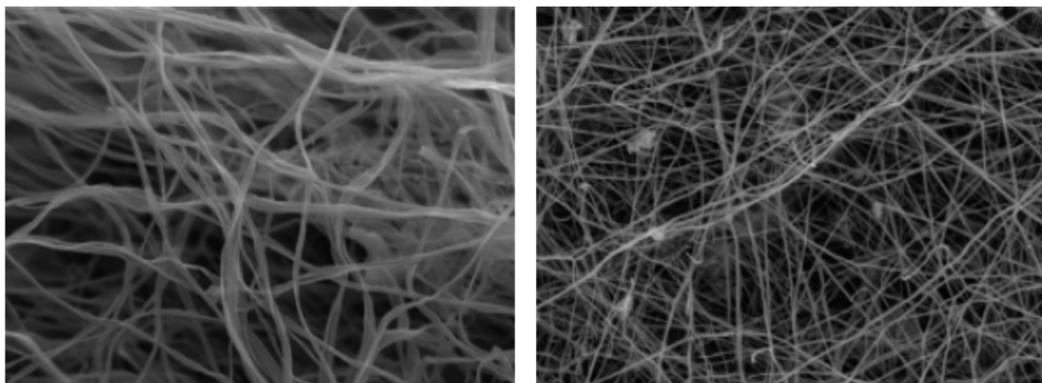
A nivel macroscópico la celulosa bacteriana es un gel tridimensional formado en la superficie de un medio líquido. A nivel molecular está formada por nano y microfibras individuales de celulosa, creando un área de superficie extensa que permite contener un alto grado de agua, sin alterar su estructura física, asociado una alta resistencia mecánica (42,43). Dependiendo de la cepa bacteriana y la fuente de carbono, puede variar la cantidad de cadenas de glucano y producir películas de celulosa con diferente composición estructural (**Figura 8**) (42).

Las diferencias estructurales en las películas de celulosa se pueden aprovechar en los procesos de bioingeniería para producir materiales con características particulares o compuestos híbridos con potencial uso en gran variedad de dispositivos (42).

Cuando se usa como apósito promueve la cicatrización ya que estimula el tejido de granulación en el lecho de una herida. También cuando se hacen hidrogeles a partir de celulosa, se evidencia la compatibilidad con el tejido conectivo y la estabilidad a largo plazo. Otros estudios han demostrado que los hidrogeles de celulosa promueven la adhesión y proliferación de las células óseas (32,42).

Se han desarrollado además implantes para vasos de pequeño diámetro y membranas como reemplazo de duramadre (11,32,42).

Figura 8. Estructura de cadenas de celulosa bacteriana producida por dos cepas diferentes de Acetobacter.



Tomado de: Czaja, W; Young, D; Kaweki; et al (42).

Por las características biológicas de la celulosa, como su alta resistencia mecánica en estado húmedo, permeabilidad a gases y líquidos, y ocasionar baja irritabilidad de la piel y otros tejidos vivos, se han desarrollado membranas gelatinosas de celulosa como piel sustituta para cobertura temporal de quemaduras, úlceras y heridas, comercialmente conocidas como BioFill® (44).

Otra de las características de la celulosa bacteriana es la posibilidad de combinarse con diferentes sustancias, sin alterar su estructura que le confiere otras propiedades que le pueden dar gran versatilidad, a la hora de tener diferentes usos, como lo realiza Yasuda et al(45), en su estudio, donde combina la celulosa bacteriana con polímeros de ácido sulfónico 2-acrylamida-2 methyl-propano y gelatina, formando una red doble de hidrogeles que son usados como sustitutos cartilagosos en articulaciones dañadas (45). También al agregarle hidroxapatita para hacer un compuesto que permita la regeneración ósea (42).

La moldeabilidad de la celulosa en el proceso de cultivo y producción, ha permitido la fabricación de tubos huecos como los manufacturados, patentados y empleados en los estudios de Roberts, et al(46); Yamanaka et al; y Klemm, et al(11); (42):

Roberts et al(46), inóculo cepas de *A. xylinum* en un medio líquido, que luego las transfirió a un molde tubular consistente en un polímero permeable a oxígeno, como la silicona. En este molde las células de *A. xylinum* se adhieren a las paredes del tubo, porque son zonas ricas en oxígeno, y van a producir la celulosa en el medio líquido que se encuentra en el lumen del molde. De esta forma se va sintetizando la CB con una configuración tubular (**Figura 9**) (42).

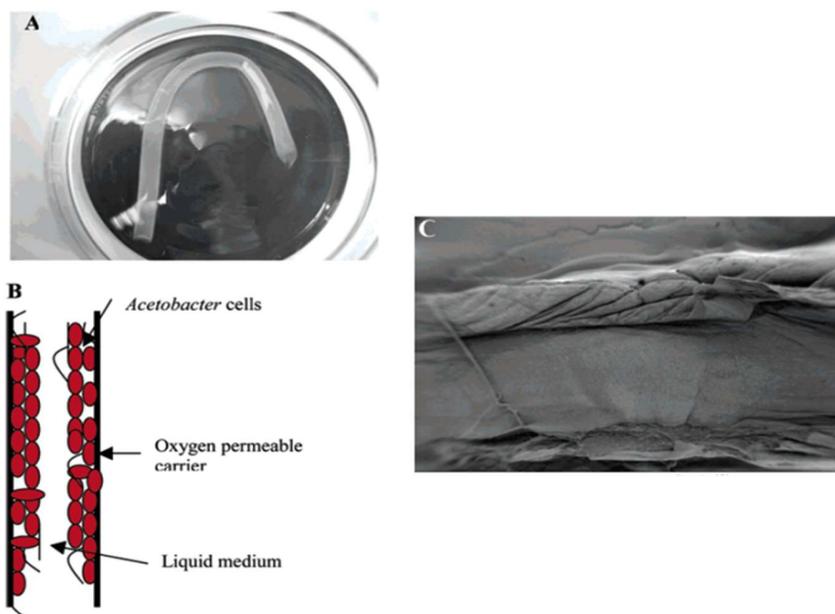
Así mismo, Yamanaka, et al(47); utilizó otra técnica para producir tubos con un diámetro entre 2 y 6 mm, empleados para reemplazar vasos sanguíneos y otras estructuras tubulares como el tracto digestivo, la uretra, la tráquea, entre otras (42).

El tubo empleado por Klemm (11) (BASYS-tube®) es producido con diferentes diámetros y longitudes tal como se observa en la (**Figura 10**). Este se probó experimentalmente en anastomosis de carótidas de ratas y se usó además como cobertura de las neurorrafias para evitar el crecimiento de tejido conectivo dentro de la anastomosis del nervio. Donde los autores observaron un comportamiento inerte del biomaterial, sin producir alteración de la regeneración nerviosa (**Figura 11**) (11), adicionalmente, al cabo de las 10 semanas se evaluó la reinervación cuantificando el peso muscular del extensor digitorum longus y la medición indirecta de la liberación de acetilcolina, teniendo resultados favorables para la recuperación nerviosa (11) .

El uso de los tubos de CB para reemplazar la neurorafia se han probado en ratas en el trabajo realizado por Kowalska, et al(13); observándose en el análisis hecho a los 180 días una formación de neuromas en solo 35% de las muestras evaluadas en el grupo en que se usó el tubo, contra el 88,67 % en el grupo control, con una diferencia estadísticamente significativa en el

análisis estadístico del número total de neuromas de los dos grupos ($p = 0.0022$) (**Figura 12**) (13).

Figura 9. Producción de un tubo de CB aplicando la técnica de Roberts.



(A) Molde de tubo de silicona en el medio líquido. (B) Las células de *Acetobacter* son organismos aeróbicos, por lo que se agregan en las zonas ricas de O₂ cerca de la pared interna del tubo de silicona, donde ellas producen y depositan la CB al medio líquido. (C) Imagen del lumen del tubo de celulosa sintetizado, donde se puede apreciar que tiene un lumen liso y altamente homogéneo.

Modificado de: Czaja, Young, & Kawecki (42).

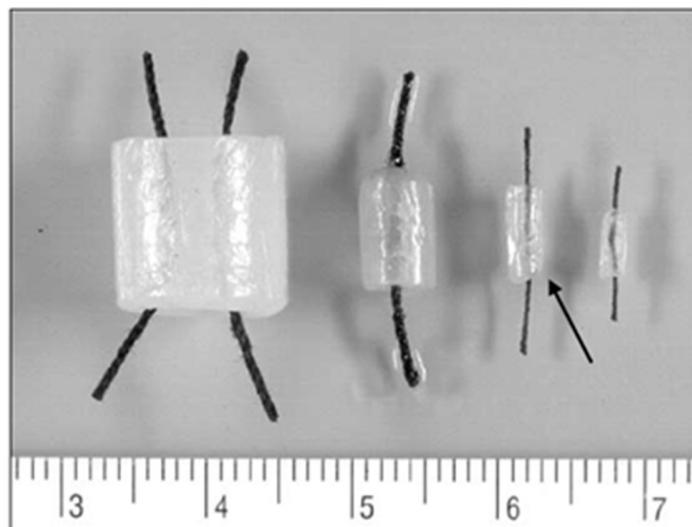
5.5. Usos del Plasma Rico en Plaquetas en Lesiones Nerviosas

Cuando se extrae plasma rico en plaquetas (PRP) de las muestras sanguíneas y se activan las plaquetas, liberan de los gránulos alfa ocho citoquinas (48,49) (**Tabla 2**):

- Factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF, del inglés: platelet-derived growth factor).

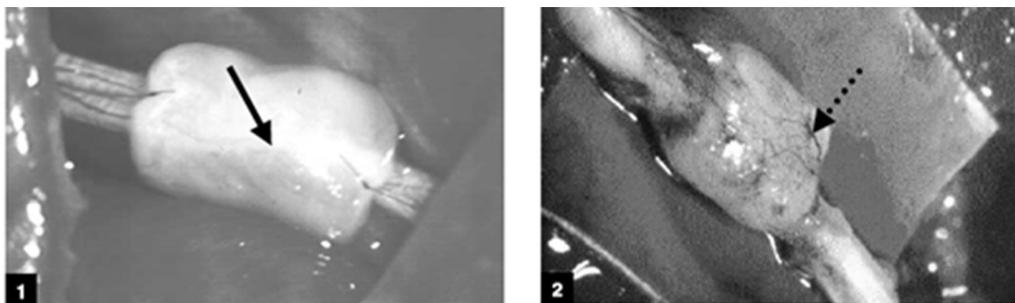
- Factor de crecimiento símil a la insulina -1 (IGF-1, del inglés: Insulin-Like Growth Factor-1).
- Factor de crecimiento transformante beta (TGF- β , del inglés: transforming growth factor-beta).
- Factor de crecimiento vascular endotelial (VEGF, del inglés: vascular endothelial growth factor).
- Factor de crecimiento de fibroblastos básico (bFGF, del inglés: basic fibroblast growth factor).
- Factor de crecimiento epidérmico (EGF, del inglés: epidermal growth factor).
- Factor de crecimiento de queratinocito (KGF, del inglés: keratinocyte growth factor).
- Factor de crecimiento de tejido conectivo (CTGF, del inglés: connective tissue growth factor).
- Interleuquina-8 (IL-8).

Figura 10. Tubos de celulosa bacteriana de diferentes diámetros y longitudes.



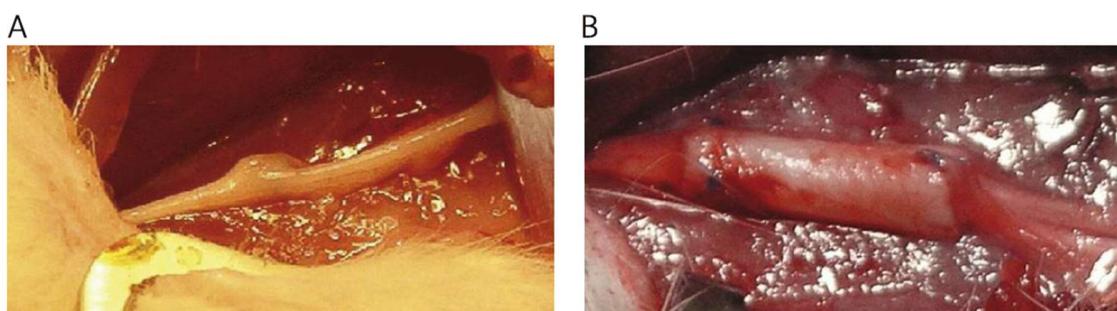
Tomado de: Klemm, D; Schumann, D; Udhardt, U; Marsch, S (11).

Figura 11. Aplicación del tubo BASYC® en neurografía



1). Tubo **BASYC®** como protector del nervio ciático de una ratona, inmediatamente después de la anastomosis. 2). Tubo **BASYC®** como protector del nervio ciático de una ratona, 10 semanas después de la anastomosis, se evidencian vasos que crecieron alrededor del tubo de CB. Tomado de: Tomado de: Klemm, D; Schumann, D; Udhardt, U; Marsch, S (11).

Figura 12. Formación de neuroma



(A) Grupo control después de 30 días, con un neuroma visible en el sitio de anastomosis. (B) Tubo de celulosa cubierto con el sobre crecimiento de nuevos vasos sanguíneos a los 90 días de implantación. Tomado de: Kowalska-Ludwicka, K; Cala, J; Grobelski, B; et al (13).

De estos, cuatro factores tienen efecto en la regeneración nerviosa (48):

- El IGF -1 es secretado por las células de Schwann, los monocitos, células del músculo esquelético y los capilares. Actúa a través de receptores para IGF-1 con dos vías de señalización, la de fosfatidilinositol 3 quinasa (PI-3K), que regula vías para la supervivencia nerviosa; y la proteína quinasa activadora de mitógenos (MAPK, del inglés: mitogen-activated protein kinase), que promueve la diferenciación y

proliferación celular. En resumen, el IGF - 1 actúa como un factor neurotrófico en las neuronas sensitivas, motoras y simpáticas, promoviendo la movilidad del cono en crecimiento, el crecimiento de las neuritas, evitando apoptosis, y favoreciendo la reinervación muscular (48).

- El TGF- β se presenta en tres isoformas $\beta 1$, $\beta 2$ y $\beta 3$. Estas dos últimas actúan en la proliferación y diferenciación de las células de Schwann, adicionalmente son requeridos para regular otros factores neurotróficos como el NGF y el bFGF (48).
- El bFGF juega un papel en la estimulación y diferenciación de las células mesodérmicas favoreciendo el desarrollo embrionario, la reparación de los tejidos, la

Tabla 2. *Citoquinas contenidas en los gránulos alfa plaquetarios*

Citoquinas	Activación biológica básica
PDGF	Replicación celular, angiogénesis y mitógeno de fibroblastos
IGF-1	Regulación de crecimiento y diferenciación tisular en varios órganos
TGF-beta	Angiogénesis
bFGF	Estimula la proliferación de mioblastos y la angiogénesis
VEGF	Potente factor angiogénico
KGF	Efecto proliferativo en células epiteliales y media la migración de los queratinocitos
EGF	Proliferación de células mesenquimales y epiteliales
IL-8	Quimiocina
CTGF	Angiogénesis, renegación de cartilago, fibrosis y adhesión plaquetaria

Tomado de: Yu, Wang, & Yin (48).

cicatrización, la neuroprotección y la regeneración nerviosa. Su activación influye en el crecimiento de neuritas regulando otros factores de crecimiento. Sus niveles se ven aumentados en los axones lesionados, células de Schwann (CS), células endoteliales, fibroblastos y macrófagos (48).

- El VEGF es un potente factor angiogénico que estimula la formación de nuevos vasos y aumenta la permeabilidad vascular, además de tener una acción neurotrófica promoviendo la proliferación del sistema nervioso al actuar en el cono de axones en crecimiento y en las CS. También se cree que aumenta la supervivencia nerviosa (48).

Sin embargo, también se ha descrito que el PDGF también tiene un efecto mitogénico en las CS de ratas (49)

Bastami, et al(15) en enero del 2.017 realizó una revisión de artículos publicados en inglés sobre uso del plasma rico en plaquetas (PRP) que tuvieran como soporte estudios realizados in vivo, reportando hallazgos histológicos, publicados hasta mayo del 2.016; de 43 artículos encontrados finalmente se seleccionaron 17. Se reporto que los individuos intervenidos se distribuyeron en los diferentes artículos así: 14 en ratas, 1 en oveja, 1 en conejo y 1 en conejillo de indias. En cuatro de los estudios se analizaron lesiones nerviosas por aplastamiento, en el resto lesiones tipo neurotmesis o que requirieron anastomosis. El período de estudio oscilo entre 4 semanas y 6 meses, en los estudios histológicos se analizaron número de axones, grosor de la mielina, su relación con el diámetro del axón y la densidad de las fibras de mielina. Por las diferencias metodológicas entre los estudios en cuanto a especie animal, tipo de lesión, dosis de plasma rico en plaquetas, tipo de reparación nerviosa y uso o no de neurotubos, no fue posible realizar un análisis estadístico. Aún, así, se encontró en todos los estudios un resultado favorable para la regeneración nerviosa en los casos en que se usó el plasma rico en plaquetas versus los casos control (15).

En el estudio de Sariguney et al(16), en el cual se analizó el resultado de la recuperación de la lesión nerviosa reparada con sutura epineural directa y uso de plasma rico en plaquetas realizado en un modelo murino, encontró que en el grupo en que se realizó seis suturas con adición de plasma rico en plaquetas tuvo un menor tiempo de latencia en la electromiografía ($p < 0,001$) y una capa de mielina más gruesa en el estudio histológico ($p < 0,003$) que el grupo con reparación con seis suturas sin plasma (16).

6. Metodología

6.1. Diseño del Estudio

Estudio de tipo experimental preclínico fase I con base en un modelo animal (murino).

6.2. Población de referencia.

Ratas macho tipo Wistar - línea albina de la rata parda, especie *Rattus norvegicus*, (organismo modelo en estudios de investigación experimental). Animales del laboratorio disponibles en el bioterio de la Facultad de Salud de la Universidad Industrial de Santander (UIS), sitio que cumple los protocolos de experimentación animal avalados por la normatividad vigente.

6.3. Criterios de inclusión y exclusión.

6.3.1. Criterios de inclusión:

Se incluirán ratas provenientes del bioterio de la universidad, seleccionadas y garantizadas exclusivamente para este estudio y que cumplan con las siguientes características:

- Tipo Wistar línea albina
- Macho

- Adultos jóvenes de 3 a 4 meses de edad.
- Peso de 350 a 450 gr para la edad.

6.3.2. Criterios de exclusión:

Ratas con patrones de comportamiento anormales (sueño-vigilia, actividad motora, consumo de alimentos) o signos de enfermedad, según lo definido por el personal del bioterio de la universidad.

Ratas intervenidas previamente en otros estudios.

6.4. Procedimientos

6.4.1. Producción de la membrana de celulosa bacteriana.

La membrana de celulosa bacteriana fue producida en los laboratorios de química experimental del Centro de Estudios e Investigaciones Ambientales (CEIAM) de la UIS, mediante un proceso fermentativo del mucílago de cacao, residuo que se produce en los procesos de extracción de las semillas de la fruta del cacao, según protocolos estandarizados de este laboratorio (50) (**Figura 13**). Obteniendo membranas circulares de aproximadamente 10 cm de diámetro por 2 mm de grosor. De las cuales se tomaba 1 cm² para envolver la neurorrafia en el momento del procedimiento quirúrgico (**Figura 14**).

Posteriormente se transportó la CB hasta el lugar del procedimiento quirúrgico cuidando las normas de seguridad, esterilidad, embalaje y transporte para garantizar su adecuada conservación.

6.4.2. Obtención del plasma rico en factores de crecimiento derivado de plaquetas (PRFC):

A partir de la sangre obtenida de una rata donante, a la que se le aplicó anestesia intraperitoneal con Ketamina 90Mg/Kg y Xilacina 10 mg/kg (51), y posteriormente se procedió a la extracción sanguínea por medio de punción cardiaca terminal (52).

Luego, la muestra obtenida se mezcló con anticoagulante de EDTA y se centrifugó a 2500rpm por 8 minutos. Seguidamente se extrajo el plasma rico en plaquetas (PRP) con una micropipeta. Y éste fue activado con 0,3 ml de gluconato de calcio por cada ml de plasma obtenido, para la liberación de los factores de crecimiento y su posterior aplicación directa en la neurorrafia (**Figura 15**).

Figura 13. Proceso de producción de la membrana de celulosa bacteriana.



6.4.3. Procedimiento quirúrgico

A cada rata se le practicó el procedimiento bajo anestesia intraperitoneal con Ketamina 90Mg/Kg y Xilacina 10 mg/kg (51). Luego, se rasuro la pata a intervenir y en posición decúbito prono, se realizó la cirugía: se dibujó una línea desde el trocánter mayor al cóndilo lateral del

fémur derecho, donde se hizo la incisión con bisturí hoja número 15. Seguidamente se practicó bajo técnica microquirúrgica (**Figura 16**) una disección roma de los músculos vasto lateral y vasto intermedio, para exponer el nervio ciático (NC) (**Figura 17**), el cual se seccionó de forma transversal dependiendo el grupo de intervención (**Figura 18**). Se practicó una neurorrafia epiperineural con nylon 9-0 (**Figura 19**), hasta lograr adecuada coaptación de los cabos. Luego se hizo la aplicación del plasma rico en plaquetas previamente activado y se envolvió la neurorrafia con la biomembrana de celulosa bacteriana, la cual se suturó con nylon 9-0 para darle estructura tubular, según el grupo de intervención (**Figura 14 y Figura 20**). Se suturó la piel con prolene 5-0. Finalmente, se ubicó el animal en su jaula para su recuperación bajo condiciones estandarizadas para todos los individuos.

***Figura 14.** Apariencia de la membrana de celulosa bacteriana, luego de sacar una muestra de aproximadamente 1 cm².*



6.4.4. Medición Índice de Función del Nervio Ciático

La medición del índice de función del nervio ciático (IFC) es una prueba avalada para evaluar la función motora del NC en ratas con éste lesionado (16,18,53–55). Con la cual aplicando una fórmula matemática que puede estimar el grado de funcionalidad del NC de forma cuantitativa para hacer el seguimiento de la recuperación nerviosa.

En el proyecto se midió el IFC previo a la lesión del nervio y luego a los 45, 60 y 90 días de la intervención.

Esta prueba se inicia con el registro de las huellas de las patas traseras del animal que se impregnan en tinta para que las imprima en un papel absorbente colocado en un corredor de marcha de 52 X 12,2 X 7,5 cm, que termina en un refugio para el animal (**Figura 21**). Por donde se pone a caminar la rata.

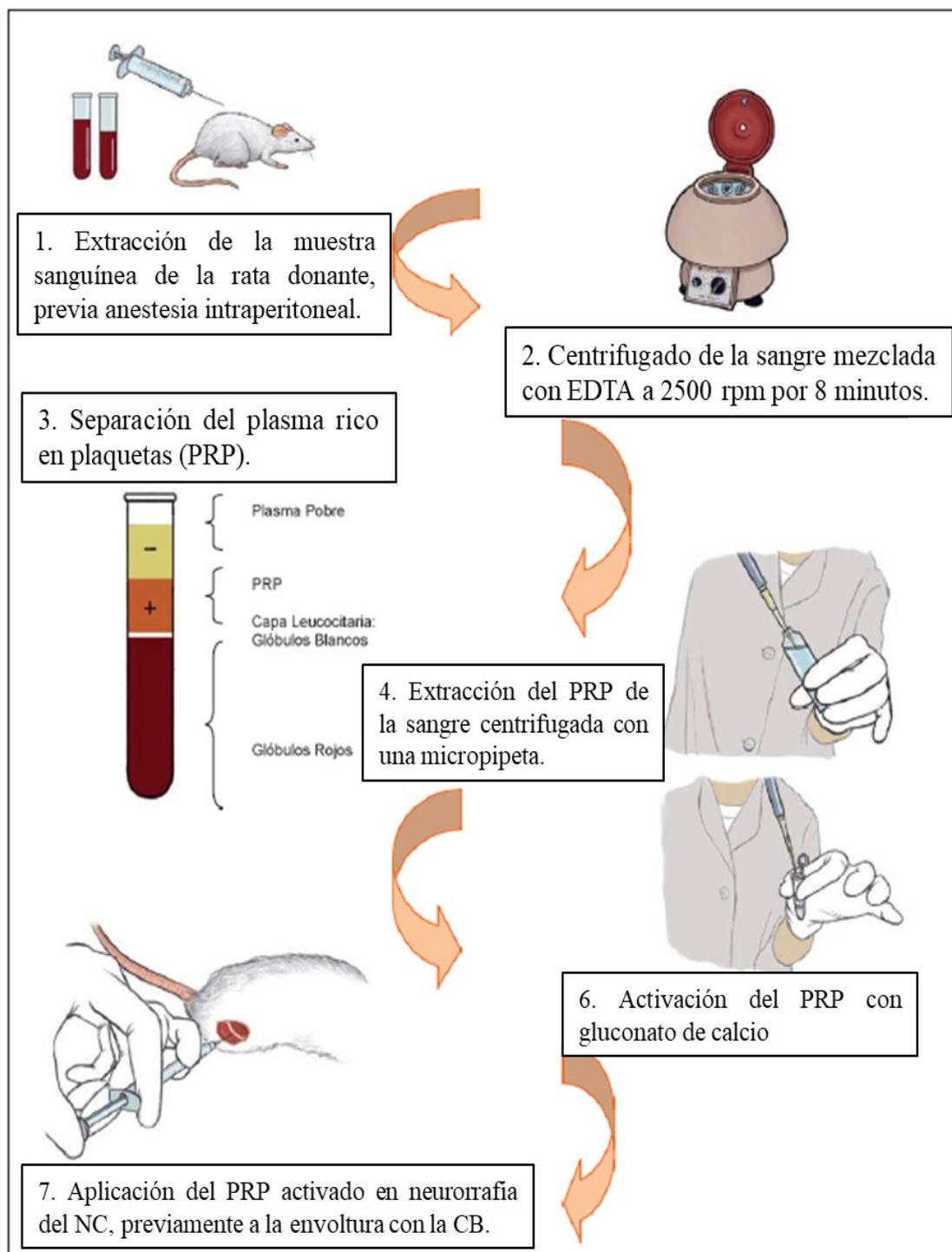
De este registro se escogió como máximo 10 de las mejores huellas, a las cuales se les tomó tres medidas:

- Longitud total de la pata (LP), medida desde el talón a la punta del tercer dedo.
- Distancia transversal (DT), entre el primero y quinto dedo.
- Distancia entre los dedos medios (DM), desde el segundo y cuarto.

Después de medir los valores normales (N), de la pata izquierda, y los valores de la pata derecha, intervenida en la cirugía (C), se calcula el IFC mediante la fórmula modificada por Bain(54) (**Figura 22**).

Esta fórmula da un valor negativo donde los valores cercanos a 0 se consideran como función del NC normal.

Figura 15. Proceso de obtención del plasma rico en factores de crecimiento derivado de plaquetas



Nota: Modificado de Sorrenti, N; Fossati, S; Fossati, G (18).

6.4.5. Condiciones de alojamiento de los especímenes.

Los sujetos del experimento fueron manejados en el bioterio de experimentación del departamento de ciencias básicas de la facultad de salud de la Universidad Industrial de Santander, donde la reproducción, crianza y condiciones de alojamiento de los animales se hizo bajo parámetros controlados según lo descrito en el **(Apéndice A)**.

Figura 16. Procedimiento quirúrgico, realizado con técnica microquirúrgicas.



Figura 17. Exposición del nervio ciático (NC).



Figura 18. Sección del Nervio Ciático.



Figura 19. Neurorrafia epiperineural del NC.

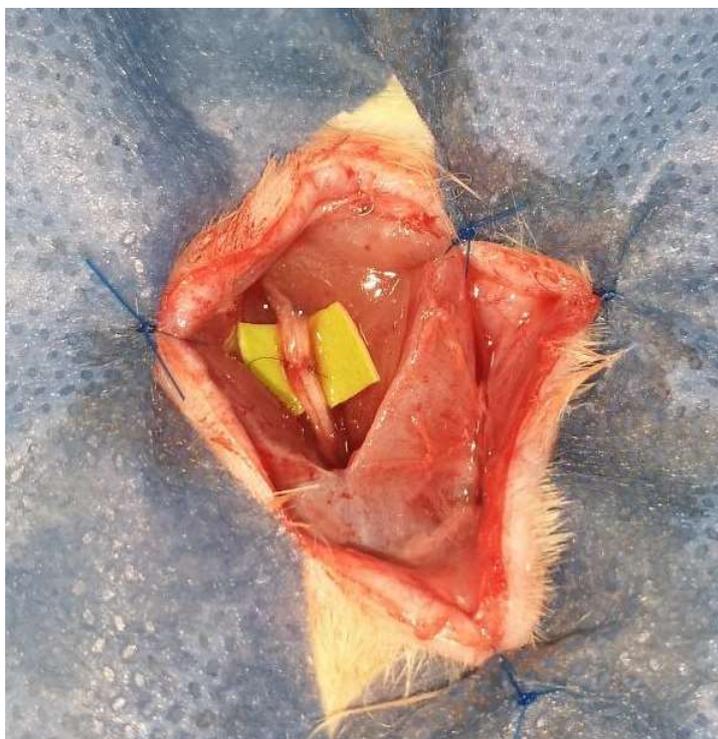


Figura 20. Nervio ciático envuelto en la membrana de celulosa bacteriana.

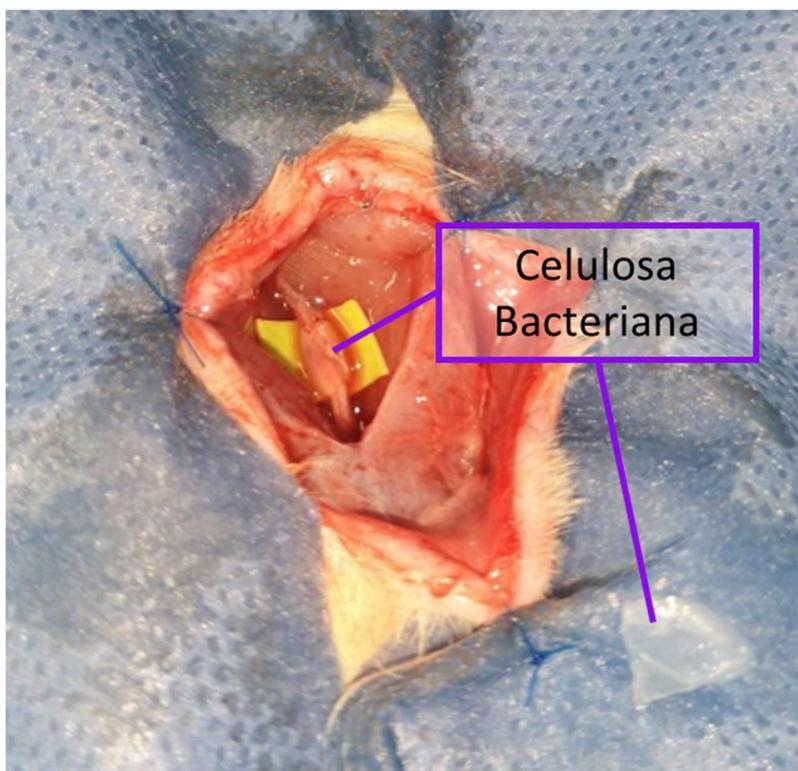
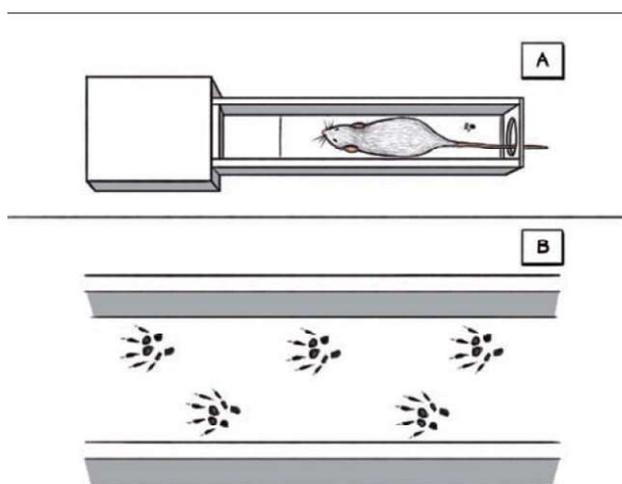


Figura 21. Registro de las huellas en corredor de marcha.



Nota: Tomado de Sorrenti, N; Fossati, S; Fossati, G (18).

Figura 22. Fórmula para calcular el IFC.

$$\text{IFC} = -38.3 \times \frac{\text{CLP} - \text{NLP}}{\text{NLP}} + 109.5 \times \frac{\text{CDT} - \text{NDT}}{\text{NDT}} + 13.3 \times \frac{\text{CDM} - \text{NDM}}{\text{NDM}} - 8.8$$

Nota: Tomado de Sorrenti, N; Fossati, S; Fossati, G (18).

6.4.6. Recolección de muestras para estudios de patología

Luego de completado el seguimiento, a cada individuo del estudio (excepto a la rata #17) se le practicó la eutanasia con una sobredosis de anestesia intraperitoneal con Ketamina(13). Se realizó la misma disección quirúrgica explicada previamente para el procedimiento quirúrgico, y de esta forma exponer el nervio ciático derecho para tomar la muestra para el estudio histológico. Extrayendo el NC desde su origen hasta la porción distal a su bifurcación en sus 3 ramas (nervio peroneo, tibial y safeno) (**Figura 23**).

Luego se procedió con la necropsia siguiendo los protocolos estipulados para animales de experimentación (56), extrayéndose para su análisis muestras del corazón, pulmón, hígado, bazo, riñón y páncreas (**Figura 24**).

Las muestras obtenidas fueron fijadas en formol al 10% en frascos independientes, respectivamente rotulados. En el laboratorio de patología de la UIS fueron procesadas según sus protocolos, para aplicar tinciones de hematoxilina y eosina (HE) (**Apéndice B**). Posteriormente estas muestras fueron entregadas al patólogo, quien no conocía que intervención tuvo cada espécimen, para su lectura.

A la rata # 17 del grupo 2 (neurorrafia + PRFC y MCB) se le practicó eutanasia y se prepararon los órganos según el protocolo del (**Apéndice B**) para procesar las láminas de histología con la tinción de azul de toluidina, que posteriormente fueron leídas y fotografiadas en

microscopía óptica de alta resolución (MOAR), haciendo una lectura descriptiva de estas por parte del patólogo.

Figura 23. Muestra del nervio ciático para estudio histológico



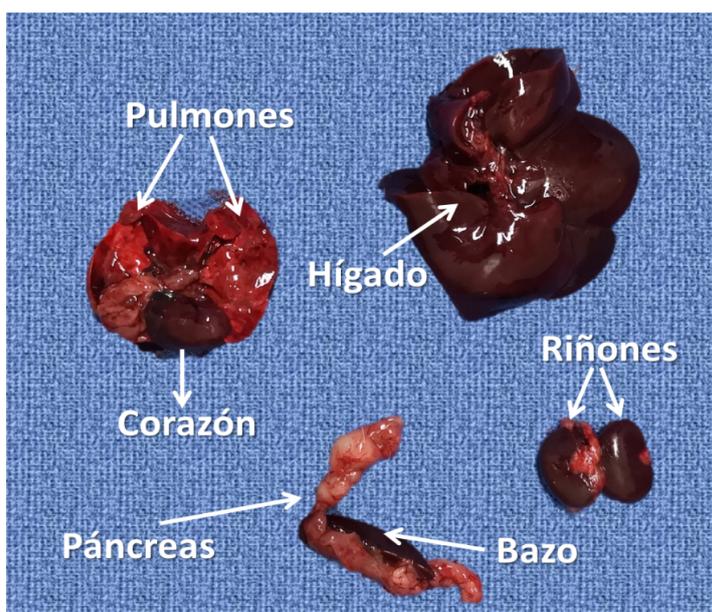
6.5. Variables.

Variable resultado: Se consideró variable resultado a la reinervación nerviosa evaluada clínica e histológicamente según las siguientes definiciones:

- Midiendo la regeneración nerviosa según estado funcional mediante el índice de función del nervio ciático (IFC).
- Histológica con tinción de hematoxilina-eosina donde el patólogo definió e identificó las siguientes variables:
 - Regeneración nerviosa: Organización de los fascículos en el segmento proximal y distal. Además de la presencia de angiogénesis y tejido fibroso alrededor de la anastomosis.

- Identificación de inflamación nerviosa: Definida como la presencia de linfocitos alrededor de los fascículos nerviosos, donde se consideró como leve cuando habían $<$ de 3 linfocitos y severa cuando habían $>$ 3 linfocitos.
- Neuroma: Definido como proceso reparativo nervioso donde hay interrupción de la continuidad de los fascículos, presentando pérdida de los axones en el segmento proximal de la lesión y retracción de los axones en el segmento distal, secundario a la degeneración Walleriana. Asociado al aumento de la regeneración del nervio y una masa células de Schwann y fibroblastos (57).

Figura 24. Órganos extraídos durante la necropsia



Adicionalmente se evaluó la seguridad de la membrana de CB y el PRFC como variables resultado al hacer la evaluación de la aparición de complicaciones (mortalidad, cambios inflamatorios, dehiscencia, automutilación, agresividad), signos de inflamación asociada a la membrana de CB evaluada en el estudio histológico, alteraciones inflamatorias en los órganos de la necropsia que se evaluaron histológicamente.

Variable explicativa: Tipo la intervención terapéutica aplicada a cada individuo.

Variable independiente: Variables no modificadas por el investigador:

- Edad
- Peso al inicio y al finalizar el estudio
- Complicaciones:
 - Mortalidad
 - Cambios inflamatorios: respuesta inflamatoria clínicamente evaluada por signos que podrían sugerir enfermedad asociada como:
 - Fiebre
 - Cambios en el apetito
 - Cambios de inflamación localizada en la extremidad: edema, induración, calor local, eritema, salida de material purulento.
 - Dehiscencia
 - Hematoma
 - Automutilación
 - Cambios de comportamiento (agresividad).

En la **(Tabla 3)** se hace la clasificación de cada variable obtenida.

6.6. Tamaño muestral.

Se determino teniendo en cuenta a la disponibilidad de espacio y tiempo de dedicación del personal técnico del bioterio de la Universidad Industrial de Santander, además de la conveniencia según razones logísticas como ha sido estipulado previamente en modelos murinos de distintas patologías de interés en cirugía plástica (58). Por tanto, se ajustó el tamaño de la

muestra a un total de 23 individuos, teniendo en cuenta un mínimo de 5 observaciones en cada subgrupo.

A cada individuo se le asignó una denominación numérica según una secuencia aleatoria generada con el programa Microsoft Excel versión 2205.

Tabla 3. Tabla Operacional de Variables

<i>Variable</i>	<i>Clasificación</i>	<i>Escala De Medición</i>	<i>Descripción Operativa</i>
Exposición a la MCB + PRFC + Neurorrafia	Cualitativa nominal dicotómica	Si/ No	Variable explicativa
Exposición a MCB + Neurorrafia	Cualitativa nominal dicotómica	Si/ No	Variable explicativa
Exposición a MCB Sin Neurorrafia	Cualitativa nominal dicotómica	Si/ No	Variable explicativa
No Exposición MCB, Ni Neurorrafia	Cualitativa nominal dicotómica	Si/ No	Variable explicativa
Cirugía simulada: no lesión del NC	Cualitativa nominal dicotómica	Si/ No	Variable explicativa
Índice de Función del Nervio Ciático (IFC)	Cuantitativa discreta	Valores de – 134 a 0	Recuperación motora luego de la lesión del NC (Variable dependiente)
Edad	Cuantitativa discreta	Enumeración en días	Características de la población (Variable dependiente)
Peso	Cuantitativa continua	Enumeración en gramos	Características de la población (Variable dependiente)
Cambios inflamatorios (Fiebre, cambio del apetito o inflamación de la extremidad)	Cualitativa Nominal Dicotómica	Si/No	Complicaciones (Variable dependiente)
Cambios Comportamentales (Agresividad)	Cualitativa Nominal Dicotómica	Si/No	Complicaciones (Variable Dependiente)
Hematoma	Cualitativa Nominal Dicotómica	Si/no	Complicaciones (Variable Dependiente)
Dehiscencia	Cualitativa Nominal Dicotómica	Si/no	Complicaciones (Variable

Automutilación	Cualitativa Nominal Dicotómica	Si/No	Dependiente) Complicaciones (Variable Dependiente)
Mortalidad	Cualitativa Nominal Dicotómica	Si/No	Complicaciones (Variable Dependiente)
Variables Histológicas			
Axones	Cualitativa Nominal Dicotómica	Si/No	Presencia de axones (Variable dependiente)
Cambio de la morfología del nervio	Cualitativa Nominal Dicotómica	Si/No	Cambio de la arquitectura nerviosa (Variable dependiente)
Regeneración nerviosa	Cualitativa Nominal Dicotómica	Si/No	Organización de fascículos y angiogénesis (Variable dependiente)
Inflamación nerviosa	Cualitativa Nominal No Dicotómica	No/leve/severa	Presencia de linfocitos (Variable dependiente)
Neuroma	Cualitativa Nominal Dicotómica	Si/No	Alteración del proceso regenerativo (Variable dependiente)
Membrana de CB	Cualitativa Nominal Dicotómica	Si/No	Presencia de MCB en el nervio (Variable dependiente)
Inflamación de la MCB	Cualitativa Nominal Dicotómica	Si/No	Presencia de inflamación asociada a la MCB (Variable dependiente)
Órgano normal (Riñón, hígado, páncreas, corazón, pulmones, bazo)	Cualitativa Nominal Dicotómica	Si/No	Cambios de la arquitectura del órgano asociado a inflamación (Variable dependiente)

Nota: MCB: Membrana de celulosa bacteriana, PRFC: Plasma rico en factores de crecimiento, NC: Nervio ciático.

7. Asignación de las Intervenciones.

Fase I: se realizó la asignación de cada individuo a uno de los grupos de estudio de manera aleatoria, según la secuencia numérica previamente mencionada. Dividiendo a la población en 5 grupos de intervención. A los grupos 1 al 4 se les practicó una lesión del nervio ciático (NC) derecho, mientras que a los individuos del grupo 5 no se le practicó ninguna lesión (**Figura 25**).

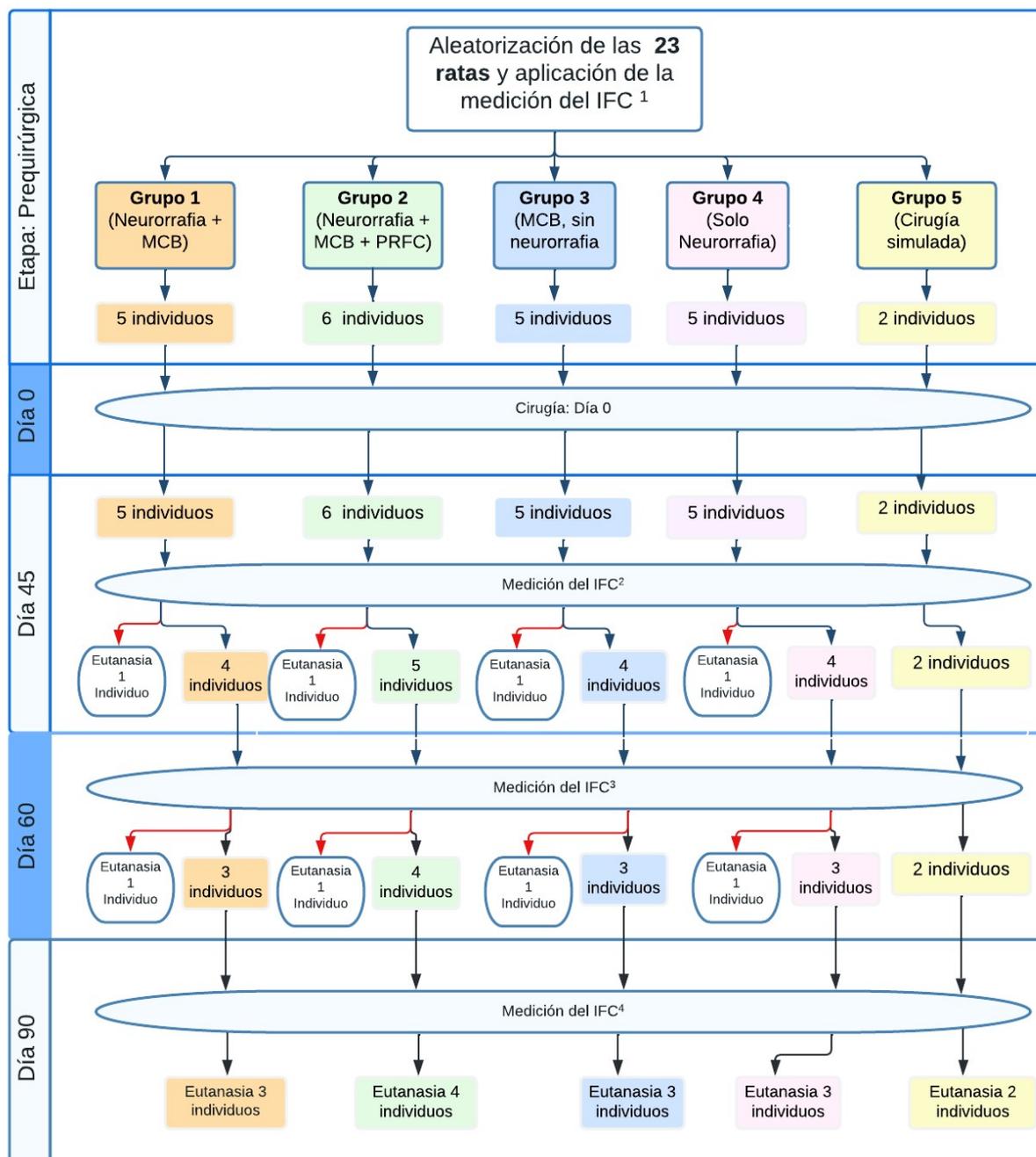
La intervención para cada grupo se distribuyó así (**Tabla 4**) (**Figura 25**): **grupo 1**, de 5 individuos a los cuales se les practicó la neurorrafia envuelta en la MCB; **grupo 2**, de 6 individuos, se les realizó la neurorrafia envuelta en la MCB con PRFC; **grupo 3**, de 5 individuos, con NC envuelto en la MCB, sin neurorrafia; **grupo 4**, de 5 ratas a las que se le hizo reconstrucción sólo con neurorrafia; **grupo 5**, de 2 ratas a las que se les hizo una cirugía simulada (CS), es decir se les hizo la misma disección que a las demás, en la pata derecha, pero no se le hizo una lesión del NC.

En esta fase se aplicó la prueba motora de medición del IFC, previo a la intervención quirúrgica. Luego se realizó el procedimiento quirúrgico, dando inicio al estudio.

Fase II: Se realizó el seguimiento de cada individuo para la evaluación de las variables así (**Figura 25**):

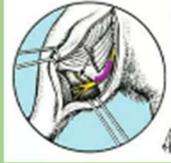
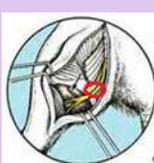
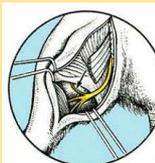
VARIABLES DE LAS CARACTERÍSTICAS DE LA POBLACIÓN (EDAD Y PESO) SE EVALUARON AL INICIAR Y AL FINALIZAR EL ESTUDIO (**Apéndice: Instrumento de recolección de datos los está adjunto en la carpeta y puede visualizarlos en la base de datos de la biblioteca UIS**).

Figura 25. Flujo de Intervenciones



IFC¹: índice de función del nervio ciático prequirúrgico. IFC²: índice de función del nervio ciático medido a los 45 días de la cirugía. IFC³: índice de función del nervio ciático medido a los 60 días de la cirugía. IFC⁴: índice de función del nervio ciático medido a los 90 días de la cirugía. MCB: membrana de celulosa bacteriana. PRFC: plasma rico que factores de crecimiento.

Tabla 4. Grupos de intervención.

EN NERVIPO CIÁTICO DERECHO				
<p>Grupo 1 Epi- perineurorrafia + MCB</p>  <p>Sin PRFC</p> <p>5 Individuos</p>	<p>Grupo 2 Epi- perineurorrafia + MCB + PRFC</p>  <p>con PRFC</p> <p>6 Individuos</p>	<p>Grupo 3 MCB sin Epi- perineurorrafia</p>  <p>5 Individuos</p>	<p>Grupo 4 Epi-perineurorrafia sin MCB y sin PRFC</p>  <p>5 Individuos</p>	<p>Grupo 5 Cirugía simulada</p>  <p>2 Individuos</p>

Nota: imágenes de la tabla modificadas de: López Cubas C. (59)

Medición del IFC: previo a la intervención quirúrgica, a los 45, 60 y 90 días de la cirugía.

- Las variables de las complicaciones se evaluaron durante todo el estudio.

Se aclara que en el postoperatorio inmediato durante el periodo del refinamiento de la técnica quirúrgica fallecieron 2 ratas del grupo 1 (neurorrafia + MCB) y 2 ratas del grupo 5 (cirugía simulada), que fueron reemplazadas para completar el tamaño muestral de 23 individuos. A los nuevos individuos incluidos se les asignó una intervención de forma aleatoria (**Apéndice: Instrumento de recolección de datos los está adjunto en la carpeta y puede visualizarlos en la base de datos de la biblioteca UIS**).

Fase III: Se le aplicó la eutanasia a uno de los individuos de los grupos del 1 al 4 en los puntos de corte de los 45 y 60 días, al resto de individuos se les aplicó la eutanasia a los 90 días

(Figura 25). En esta fase se realiza el análisis histológico con tinción de HE a todos los individuos del estudio, excepto a 1 individuo escogido de forma aleatoria del grupo 2 (neurorrafia + MCB y PRFC) al cual se le hizo el análisis histológico descriptivo con tinción de azul de toluidina en microscopía óptica de alta resolución (MOAR).

8. Planeamiento Operacional

En el **(Apéndice C)** se indica el programa de actividades y en el **(Apéndice D)** se indica el presupuesto del proyecto.

9. Aspectos Éticos

En este estudio experimental se aplicaron los principios que establecen las normas científicas, técnicas y administrativas para la investigación en salud según la Resolución N. 008430 del 04 de octubre de 1993 del Ministerio de Salud de la República de Colombia, título número V de la investigación biomédica con animales(60) y la Ley 84 de diciembre 27 de 1989, del Congreso de Colombia, por la cual se adopta el estatuto nacional de protección de los animales. Capítulo VI, ver(61).

Este es un estudio de investigación en modelo animal, por lo que no se aplica la clasificación de riesgo definida en el artículo 11 del título II de la Resolución N. 008430 del 04 de octubre de 1993(60). Y se concluye que en el presente estudio de investigación no se requiere la realización de consentimiento informado.

Con el fin de garantizar el bienestar animal se seguirá el protocolo sobre las condiciones de mantenimiento descrito en el **(Apéndice A)**. Adicionalmente para evitar el sufrimiento y los

estados de estrés del animal, en toda intervención quirúrgica se usó anestesia, se suministró analgesia posoperatoria y se realizó la eutanasia como se expone en la metodología del presente estudio adhiriéndose a la normatividad ya mencionada.

En cuanto al desecho del material biológico producto de la investigación, estuvo a cargo del bioterio, según los protocolos que este maneja.

Cabe resaltar que este es un proyecto que tiene como propósito producir avances científicos justificados en disminuir las secuelas de las lesiones nerviosas y sus repercusiones sociales en los pacientes, esto por medio de un modelo de experimentación usando biomateriales en la cicatrización de lesiones nerviosas, que no se podrían evaluar en un modelo invitro y requieren para su ejecución un modelo animal, pero utilizando el tamaño muestral más pequeño posible sin perder significancia estadística.

También, se hizo cumplimiento estricto de las normas establecidas en el manual de bioseguridad para el trabajo en bioterios publicado por la Universidad Industrial De Santander (62).

Adicionalmente el proyecto se desarrolló luego de la aprobación del Comité de Ética en Investigación Científica (CEINCI) de la Universidad Industrial de Santander.

10. Resultados

10.1. Manejo de Datos y Análisis Estadístico

El análisis estadístico se realizó en el programa STATA versión 15 (Texas, Statacorp), tras tabular los resultados e importar la base de datos consolidada en Microsoft Excel versión 2206 por la investigadora principal.

Se realizó un análisis univariado para describir las características basales de las ratas.

El análisis bivariado de variables cualitativas de los cambios inflamatorios, de comportamiento, dehiscencia, hematoma, automutilación y muerte, se realizó por medio de la prueba de Fisher y los resultados se expresaron en porcentajes. Las variables cualitativas de los hallazgos histológicos se expresaron en porcentajes aplicando al prueba de Fisher. Las variables cuantitativas se analizaron por la prueba de Wilcoxon y fueron expresadas en medianas. Se consideraron diferencias estadísticamente significativas cuando las pruebas del análisis bivariado arrojaban valores de $p < 0.05$. El análisis histológico de las láminas con azul de toluidina se realizó de forma descriptiva.

10.2. Análisis de resultados

Se hizo una comparación de las características de la población a estudio, encontrando que la diferencia de las edades medida en días de los individuos tuvo distintos valores de medianas con una p de 0,03. A pesar de que estos cumplían los criterios de inclusión, 3 a 4 meses de edad, momento en el cual son considerados como adultos jóvenes, pues hacia los 120 días de vida completan el desarrollo esquelético y teniendo una expectativa de vida de 2 a 3,5 años (63). Adicionalmente al tratar de calcular las diferencias del IFC ajustado por edad se encuentra un valor de p de 0,48, lo que quiere decir que esa significancia estadística encontrada en las edades no es clínicamente relevante. Por lo demás se considera que la población es estadísticamente homogénea (**Tabla 5**).

Para evaluar el efecto de la intervención sobre la neurorrafia, se aplicó la prueba de función motora indicada como IFC, ésta se calculó en términos de medianas reportada para cada corte de tiempo del estudio (**Tabla 6**), (**Figura 26**). Ninguno de los individuos expuestos a la MCB con o sin PRFC llegó a tener un valor de IFC igual al valor prequirúrgico. Sin embargo, los

sujetos expuestos a la neurorrafia asociada a MCB con o sin PRFC (grupo 1, 2 y 3) tuvieron un IFC mejor que los individuos del grupo control, solo expuestos a la neurorrafia, en la mayor parte del estudio. Aunque a los 90 días del seguimiento el grupo 3, expuesto a la MCB pero sin neurorrafia, y el grupo del tratamiento estándar (grupo 4) se igualaron. (**Figura 26**).

Tabla 5. Características biométricas

	Grupo 1	Grupo 2	Grupo 3	Grupo 4	Grupo 5	P
Mediana de edad en días al inicio del estudio.	98	112	101	98	92,5	
RIQ*	95 - 114	122 - 112	98 - 101	98 - 101	90 - 98	0.03
Min y máximo	90 - 114	96 - 114	90 - 114	90 - 101	90 - 101	
Mediana de peso en gramos al inicio del estudio.	400	417	398	393	428,5	
RIQ	387 - 419	399 - 450	382 - 420	391 - 420	421 - 436	0.63
Min y máximo	350 - 431	368 - 450	350 - 430	357 - 448	421 - 436	
Mediana de peso en gramos al final del estudio.	516	508,5	517	520	570,5	
RIQ	460 - 573	462 - 525	487,5 - 540	484,5 - 533	558 - 583	0.42
Min y máximo	452 - 588	399 - 551	464 - 557	452 - 543	558 - 583	

*RIQ (Rango Intercuartil).

Al comparar las medianas para el día 90, el grupo que presentó mejor recuperación fue el 2 (neurorrafia + MCB + PRFC) con una mediana del IFC de - 67,534, seguido por el grupo 1 (MCB + Neurorrafia) de - 85,993, y los grupos 3 (MCB sin Neurorrafia) y 4 (solo neurorrafia) ambos con una mediana de - 93,3; teniendo en consideración que los valores cercanos a 0 son los que representan la normalidad, vistos en el grupo control de CS (grupo 5), de - 4,23 ($p = 0,16$;

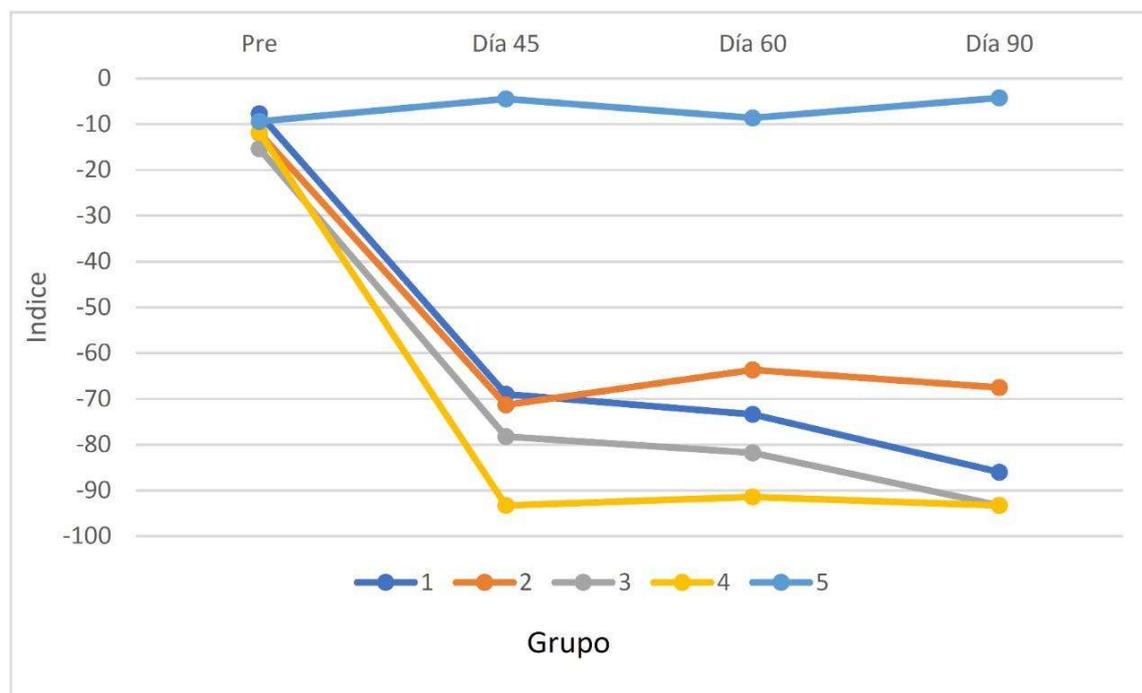
prueba de Wilcoxon). Aun así, no se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre los grupos evaluados (**Tabla 6**).

Tabla 6. Índice de función del nervio ciático (IFC)

		Grupo I	Grupo II	Grupo III	Grupo IV	Grupo V	P*
IFC Pre-quirúrgico	Mediana	-7,72	-11,87	-15,31	-11,7	-9,4	0.14
	RIQ	-7,86 a -5,71	-12,81 a -8,12	-16,26 a -13,12	-15,80 a -11,25	-18,40 a -0,33	
	Min y máximo	-12,99 a -0,744	-25,59 a -5,89	-18,49 a -12,98	-20,50 a -0,85	-18,40 a -0,33	
IFC a los 45 días	Mediana	-68,97	-71,33	-78,26	-93,3	-4,45	0.38
	RIQ	-72,07 a -65,99	-79,54 a -60,66	-83,66 a -66,78	-93,3 a -73,27	-9,79 a 0,88	
	Min y máximo	-78,05 a -40,37	-133,35 a -47,99	-87,87 a -58,90	-96,59 a -36,4	-9,79 a 0,89	
IFC a los 60 días	Mediana	-73,41	-63,69	-81,80	-91,42	-8,60	0.15
	RIQ	-80,19 a -65,10	-68,23 a -56,37	-89,85 a -71,82	-93,3 a -77,42	-14,12 a -3,09	
	Min y máximo	-82,30 a -61,47	-134,05 a -50,37	-96,43 a -63,30	-93,3 a -65,31	-14,12 a -3,09	
IFC a los 90 días	Mediana	-85,99	-67,53	-93,3	-93,3	-4,23	0.16
	RIQ	-118,14 a -64,97	-106,68 a -49,48	-102,12 a - 91,87	-93,3 a -73,05	-6,79 a -1,669	
	Min y máximo	-118,14 a -64,97	-132,05 a -45,2	-102,12 a - 91,87	-93,3 a -73,05	-6,791 a -1,669	

Adicionalmente se puede estimar según los resultados, que la mejoría se presenta de forma progresiva hasta el día 60 luego de la intervención, pero posteriormente hay una tendencia a disminuir o no mejorar el IFC (**Figura 26**). Aunque se debe tener en cuenta que, por el diseño del estudio, se tenían menos individuos al finalizar este, por lo que se hace que estos resultados sean de difícil interpretación a lo largo del tiempo.

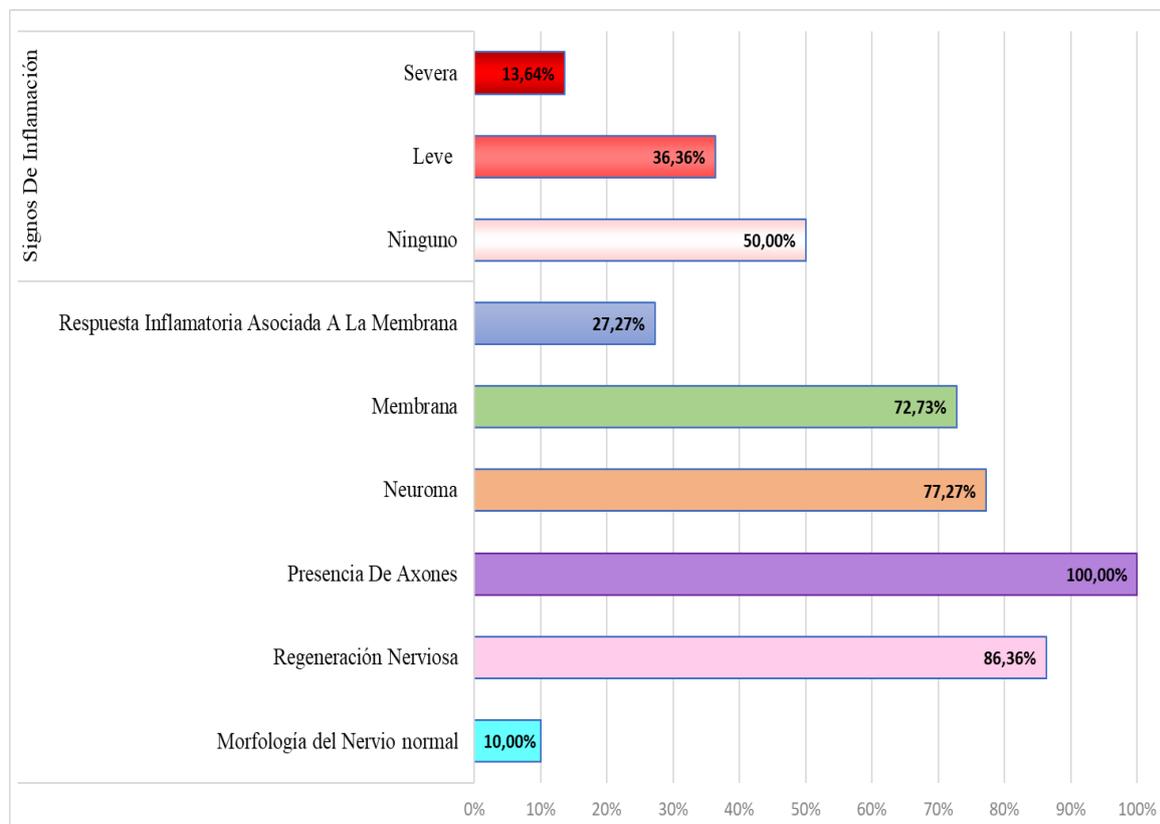
Figura 26. Cambios del IFC en el tiempo



Se evidencia que el grupo 5 (cirugía simulada) tiene los mejores valores, considerados como normales, porque no tienen lesión del nervio ciático. Los grupos con mejores resultados de IFC fueron el grupo 2 (neurorrafia + MCB y PRFC), seguido por el grupo 1 (neurorrafia + MCB), luego por el grupo 3 (MCB sin neurorrafia) y el peor valor lo tuvo el grupo 4 o grupo control (neurorrafia).

En cuanto a los estudios de histología del nervio ciático realizados con tinción de HE (en 22 ratas), se evaluó el efecto de la intervención sobre la neurorrafia al determinar: si hubo cambios en la morfología normal del nervio, si había presencia de regeneración nerviosa y si se desarrollaron axones a lo largo del nervio. Para hacer la comparación sobre el proceso de cicatrización y los cambios histológicos producidos por la MCB, asociada o no al PRFC, en un organismo vivo se evaluó si había signos inflamatorios del nervio y si se desarrolló neuroma. Para saber que cambios le producía la rata Wistar a la MCB, o la presencia de PRFC sobre la membrana se examinó: si la MCB estaba presente en todos los grupos. Así mismo, se observó si al evidenciarse la MCB se presentaba respuesta inflamatoria asociada a esta.

Figura 27. Cambios histológicos del nervio ciático de toda la población



Inicialmente se hizo un análisis de los hallazgos globales de toda la población, estuviera expuesta o no a la intervención, cullos resultados se representan en la (Figura 27) como porcentajes, y los obtenidos en cada grupo, de forma independiente, se expresaron tanto en porcentajes como en números absolutos en la (Tabla 7).

Al hacer el análisis de los hallazgos de cada variable de toda esta población (Figura 27), la *morfología normal* del nervio (Figura 28 y Figura 29) estuvo presente en el 10% de los individuos, que corresponde a los que no se les lesionó el nervio. La *regeneración nerviosa* de los sujetos fue del 86,36%. La *presencia de axones* se vio en el 100% de la población. La presencia de *neuroma* se dio en el 77,27%. Se vio la *membrana de celulosa bacteriana* (Figura 30) en el 72,73% de las ratas. Se genero *respuesta inflamatoria asociada a la membrana* en el

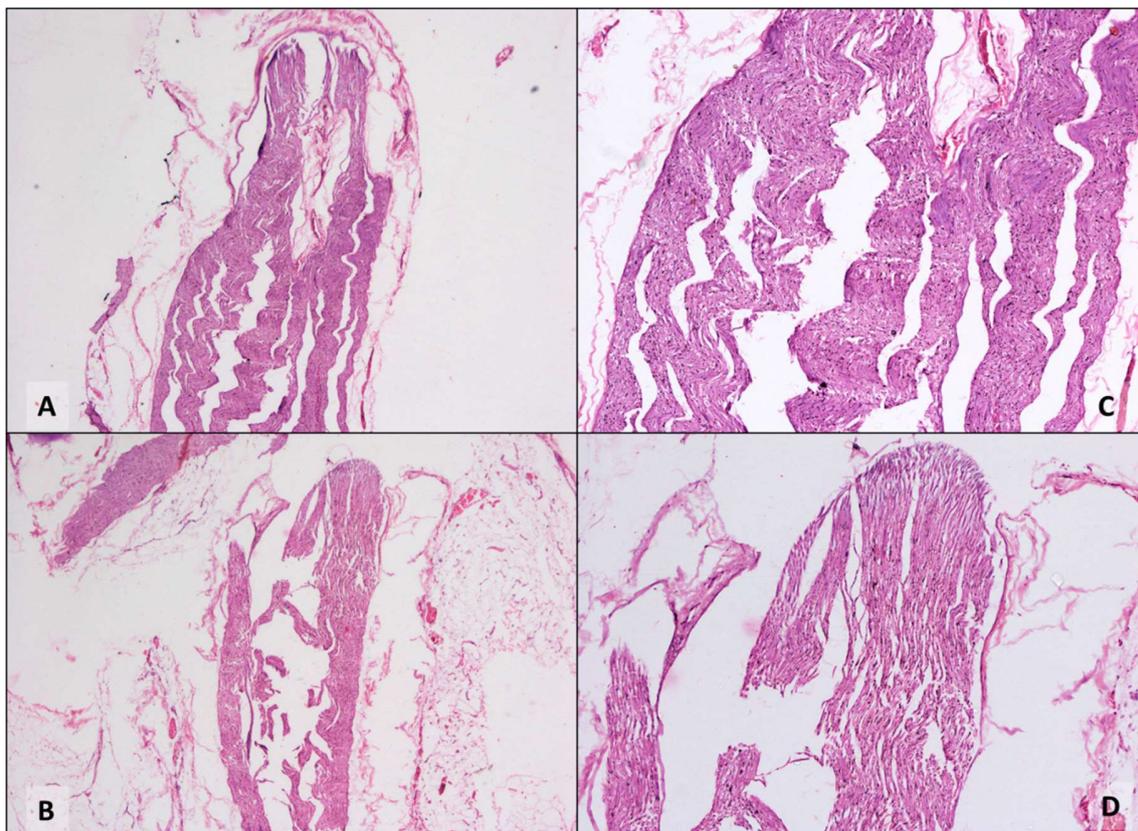
27,27%. Y finalmente los signos de inflamación del nervio se presentó de forma leve en el 36,36% y de forma severa en el 13,64% de las 22 ratas analizadas con este tipo de tinción (Figura 27).

Tabla 7. Cambios histológicos del nervio ciático al evaluar cada grupo

	Grupo									
	1		2		3		4		5	
<i>¿Es la morfología del nervio normal?</i>	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%
No	5	100,00	5	100,00	5	100,00	5	100,00	0	0,00
Si	0	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00	2	100,00
<i>¿Hay regeneración nerviosa?</i>										
No	0	0,00	0	0,00	0	0,00	1	20,00	2	100,00
Si	5	100,00	5	100,00	5	100,00	4	80,00	0	0,00
<i>¿Hay presencia de axones?</i>										
Si	5	100,00	5	100,00	5	100,00	5	100,00	2	100,00
<i>¿Hay signos de inflamación?</i>										
Ninguno	4	80,00	1	20,00	2	40,00	2	40,00	2	100,00
Leve	1	20,00	2	40,00	2	40,00	3	60,00	0	0,00
Severa	0	0,00	2	40,00	1	20,00	0	0,00	0	0,00
<i>¿Hay neuroma?</i>										
No	1	20,00	1	20,00	0	0,00	1	20,00	2	100,00
Si	4	80,00	4	80,00	5	100,00	4	80,00	0	0,00
<i>¿Hay membrana*?</i>										
No	0	0,00	0	0,00	1	20,00	3	60,00	2	100,00
Si	5	100,00	5	100,00	4	80,00	2	40,00	0	0,00
<i>¿Hay respuesta inflamatoria asociada a la membrana*?</i>										
Ninguno	3	60,00	3	60,00	1	20,00	2	40,00	0	0,00
Leve	2	40,00	2	40,00	3	60,00	0	0,00	0	0,00
No aplica	0	0,00	0	0,00	1	20,00	3	60,00	2	100,00

Nota: Diferencias de la presencia de neuroma con una $p = 0,15$, en la prueba de Fisher's exact.
 Membrana*: hace referencia a MCB.

Figura 28. Morfología normal del nervio NC, corte longitudinal



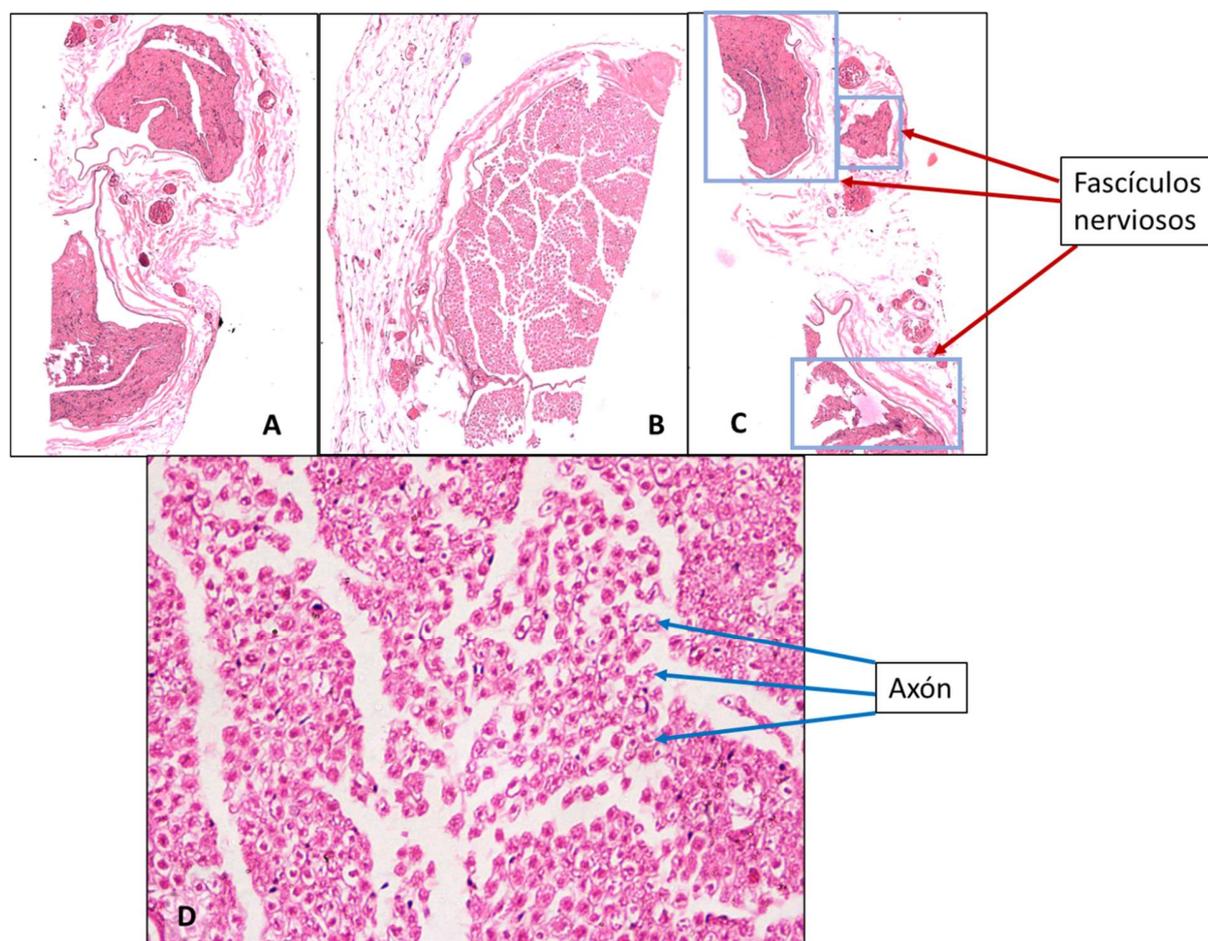
Cortes longitudinales de histología con tinción de HE, mostrando un NC de morfología normal. *A.* Segmento proximal con aumento 4X. *B.* segmento distal con aumento 4X. *C.* Segmento proximal con aumento 10X. *D.* Segmento distal con aumento 10X.

El análisis por grupos de intervención para hacer la comparación entre estos se muestra en la (Tabla 7). Donde se vio que la *morfología del nervio* era **anormal** en el 100% de los individuos de los grupos del 1 al 4, sin importar que estuvieran expuestos o no a la intervención. En cambio, en el 100% (n = 2) de la población del grupo 5 (CS) tenían morfología **normal** (Figura 28 y Figura 29), pues esta no tenía lesión nerviosa.

Como ya se mencionó previamente, otro determinante del efecto de la MCB con o sin plasma sobre la neurorrafia, fue la evaluación de la *regeneración nerviosa*. Donde se vio que todos los grupos que tenían MCB con o sin PRFC, asociado a la neurorrafia (grupo 1, 2) tuvieron

regeneración nerviosa en el 100% de la población, al igual que en el grupo 3 de solo MCB, sin neurorrafia. A diferencia del grupo control, grupo 4 de solo neurorrafia, solo el 80% (n=4) de los individuos lograron la regeneración nerviosa. Y como era de esperar en el grupo 5 de cirugía simulada ningún individuo tuvo regeneración nerviosa, porque no se les lesionó el NC (**Tabla 7**). Esto muestra que la MCB tiene algún efecto positivo sobre la regeneración nerviosa.

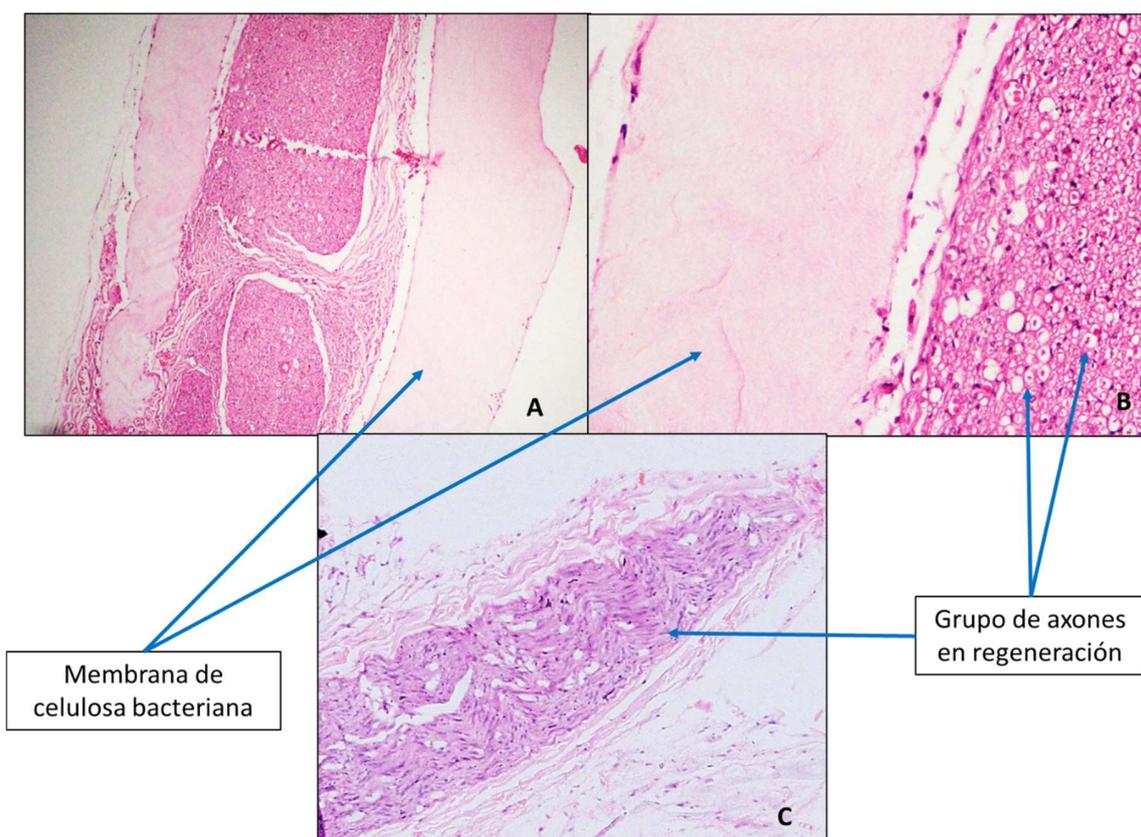
Figura 29. Nervio ciático normal, corte transversal



Cortes transversales de histología con tinción de HE, mostrando un NC de morfología normal. *A.* Segmento proximal con aumento 10X. *B.* segmento medio con aumento 10X. *C.* Segmento distal con aumento 10X. *D.* Segmento medio con aumento 40X. También se pueden apreciar los fascículos nerviosos y filetes axonales.

Adicionalmente, se *encontraron axones* (**Figura 30**) en todos los individuos evaluados, sea que tuvieran sección del NC o no, lo que muestra de cierta forma, que sin importar si hay o no exposición a la MCB y/o al PRFC, va a haber algún tipo de regeneración axonal.

Figura 30. Presencia de MCB en rata del grupo 2 (neurorrafia + MCB + PRFC)



Cortes histológicos con tinción de HE, mostrando persistencia de la MCB a los 90 días de la intervención. *A.* Corte transversal de anastomosis en aumento 10X. *B.* Corte transversal de anastomosis en aumento 40X, donde se evidencian grupos axonales en regeneración de forma transversal *C.* Corte longitudinal a nivel distal de la anastomosis en un aumento de 10X, donde se evidencian grupos axonales en regeneración de forma longitudinal.

Al evaluar la *inflamación del nervio* como efecto del proceso de cicatrización, se evidenció que el grupo que tuvo menor respuesta inflamatoria de los que se estuvieron expuestos a la intervención fue el grupo 1 (neurorrafia + MCB), ya que el 80% (n = 4) de sus individuos *no*

presentó inflamación. Y el grupo que tuvo mayor respuesta inflamatoria fue el grupo 2 (neurorrafia + MCB y PRFC) siendo un 40% (n = 2) leve y 40% (n = 2) severa, sumando el 80% de la población. Así mismo, el grupo control (grupo 4) presentó en el 60% de sus individuos inflamación leve, que es el mismo hallazgo al grupo 3 (solo MCB), con la diferencia que este tuvo el 20% de los animales con inflamación severa.

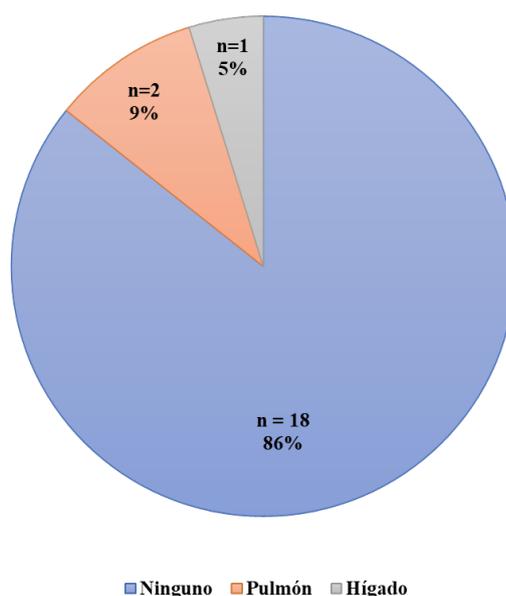
Cuando se evalúa la *presencia de neuroma* como otro signo del proceso cicatrizal, es claro que al no hacer neurorrafia se va a generar neuroma en el 100% de los individuos, como ocurrió en el grupo 3. Además, se va a producir de igual forma el neuroma haya o no haya MCB con o sin plasma al grupo control, sin tener una significancia estadísticamente significativa ($p = 0,15$, en la prueba de Fisher's exact) (**Tabla 7**).

Otra variable evaluada fue la *presencia de la MCB* (**Figura 30**), la cual estaba presente en el 100% de los individuos del grupo 1 y 2, y el 80% del grupo 3. También fue vista por el patólogo en el 40% de los individuos con solo neurorrafia. Y a la hora de evaluar si se producía *respuesta inflamatoria a la membrana* se encontró que hay una respuesta inflamatoria leve a la MCB, esté asociada o no al PRFC, pues los grupos 1 y 2, tuvieron el mismo resultado del 40%, además si no se realiza neurorrafia al usar la MCB se puede producir una respuesta inflamatoria mayor, subiendo al 60% (**Tabla 7**).

Cuando se hizo la evaluación de los órganos con tinción de HE (**Figura 31**), como representación del efecto de la MCB con o sin PRFC en un organismo vivo, no se encontraron alteraciones en la mayoría de los individuos estudiados (86%), y los únicos hallazgos se dieron a nivel del pulmón en el 9% (n = 2) de los individuos, en donde uno de ellos presento un granuloma incompleto (rata del grupo 3, MCB sin neurorrafia) y el otro una trombosis arterial (rata del grupo 4, solo neurorrafia). A nivel del hígado se encontró como hallazgo anormal una

ligera respuesta inflamatoria en las triadas portaes en 1 individuo de toda la población (5%) del grupo 1 (neurrorrafia + MCB). Al ser tan pocas las alteraciones encontradas en los órganos, no fue posible hacer el cálculo de significancia estadística.

Figura 31. Anormalidades histológicas en los órganos, tinción realizada con HE.



Como ya se mencionó previamente, a una rata del grupo 2, que tuvo neurrorrafia + MCB y PRFC, se le realizó un análisis descriptivo usando microscopia de alta resolución (MOAR) con la tinción de azul de toluidina, cuando completo 90 días luego de la intervención. Encontrando a nivel de la anastomosis la presencia de abundantes células de Schwann, la evidencia de fibras axonales en regeneración, con su envoltura de mielina (**Figura 32**) y segmentos de sutura (**Figura 33**).

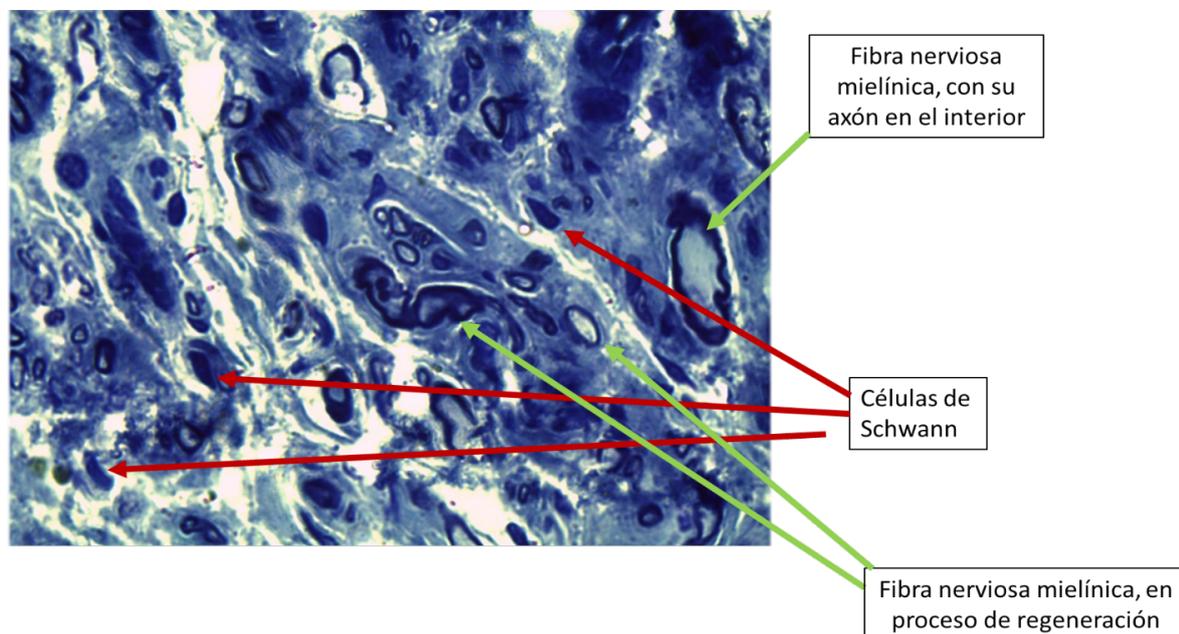
A nivel distal a la anastomosis, es decir en los nervios tibial (**Figura 34 y Figura 35**) y peroneo (**Figura 36**), también se logra ver las unidades de regeneración, que corresponden a

axones nerviosos mielínicos regenerándose, envueltos en su respectiva célula de Schwann. Adicionalmente, se aprecia una mejor organización del tejido nervioso.

Otro aspecto evaluado para determinar la seguridad de la MCB asociada o no al PRFC, fueron las complicaciones, que se definieron como cambios inflamatorios, de comportamiento, dehiscencia, hematoma, automutilación y muerte secundaria a la intervención.

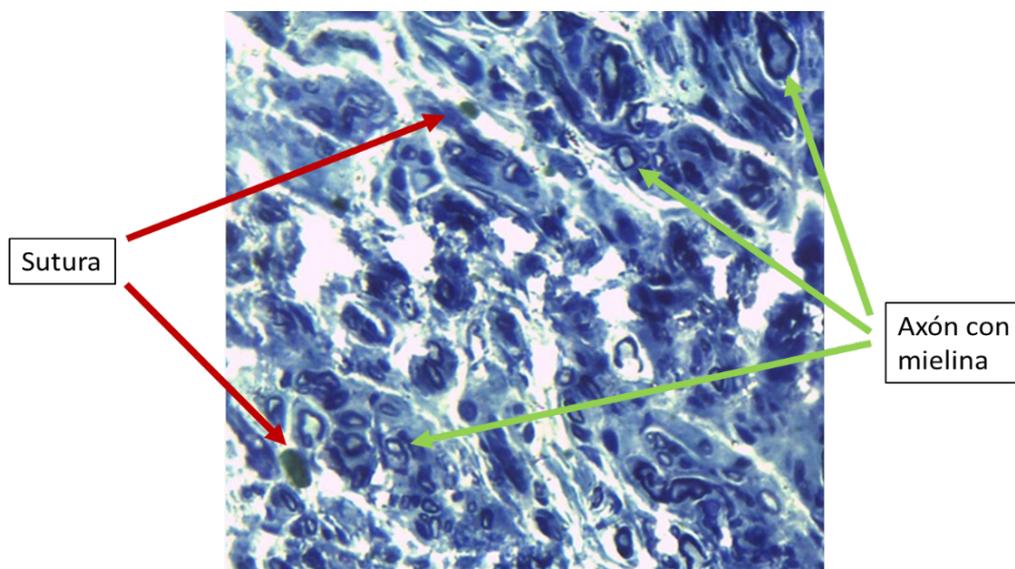
Cuando se compara las complicaciones presentadas entre los individuos expuestos a la MCB sin o con PRFC con los manejados con el tratamiento estándar, es decir la neurorrafia (grupo 4), y los que no tuvieron lesión del NC, es decir a los que se les practico CS (grupo 5), se evidencia que tuvo mayor cantidad de complicaciones los sujetos expuestos a la MCB con o sin PRFC sin ser estas diferencias estadísticamente significativas ($p = 1.000$, prueba Fisher's exact) (Tabla 8).

Figura 32. Nervio ciático a nivel de la anastomosis de rata del grupo 2



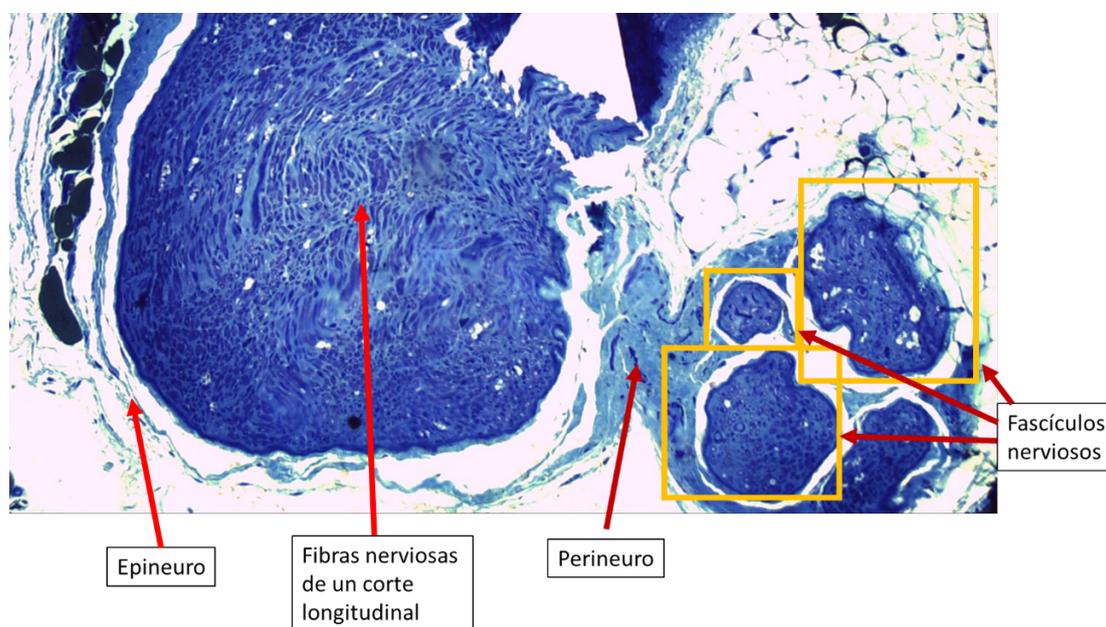
Corte transversal de tinción con azul de toluidina de la rata del grupo 2 (neurorrafia + MCB y PRFC) al día 90 de la intervención, con aumento 100 x. Corte a nivel de la rafia. Se aprecian los núcleos de las células de Schwann y los axones mielínicos en proceso de regeneración.

Figura 33. Acercamiento del nervio ciático a nivel de la anastomosis de rata del grupo 2



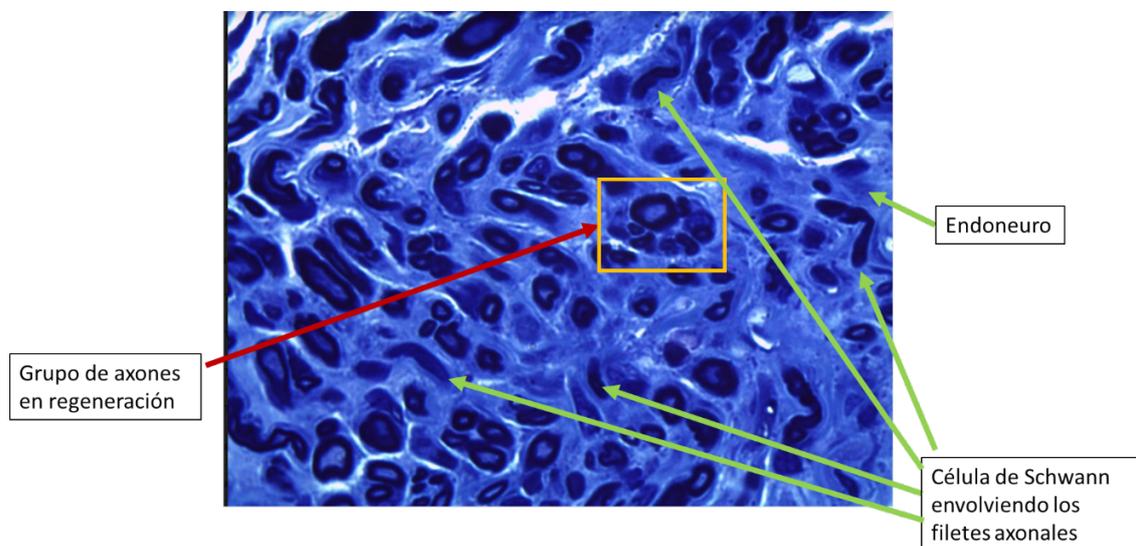
Corte transversal de tinción con azul de toluidina de la rata del grupo 2 (neurorrafia + MCB y PRFC) al día 90 de la intervención, con aumento 40 x. Corte a nivel de la rafia. Se aprecian los axones miélinicos en proceso de regeneración y fragmentos de sutura.

Figura 34. Nervio tibial (distal a la anastomosis) de la rata del grupo 2



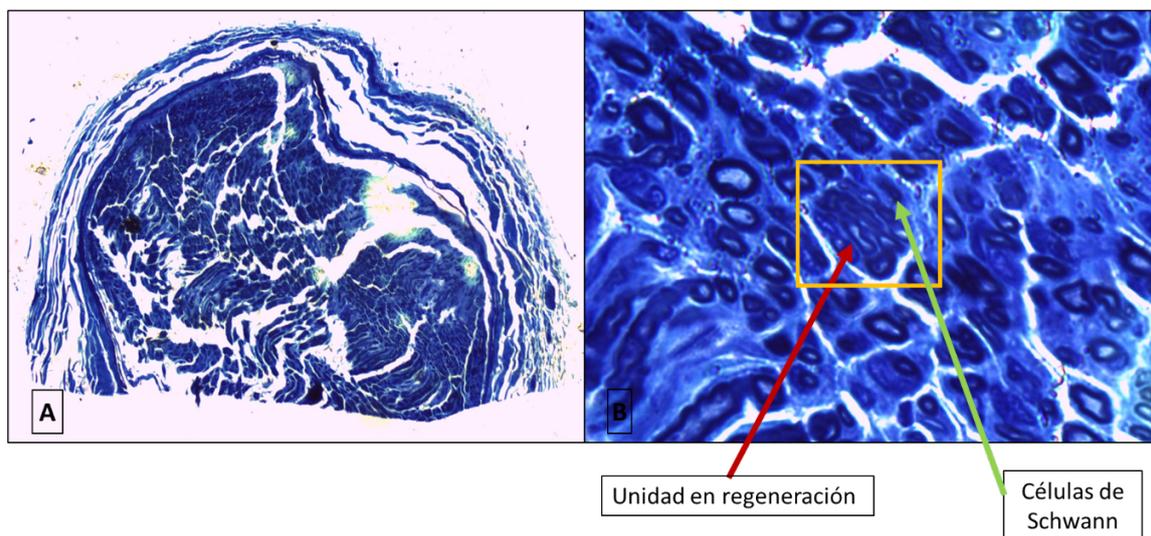
Corte transversal del nervio tibial, con tinción con azul de toluidina de la rata del grupo 2 (neurorrafia + MCB y PRFC) al día 90 de la intervención, con aumento 10 x. Se evidencian las envolturas del nervio, epineuro (el más externo), perineuro que separa un fascículo nervioso de otro (en recuadros amarillos). Y algunas fibras nerviosas con cortes oblicuos.

Figura 35. Acercamiento del nervio tibial de la rata del grupo 2



Corte transversal del nervio tibial, con tinción con azul de toluidina de la rata del grupo 2 (neurorrafia + MCB y PRFC) al día 90 de la intervención, con aumento 100 x. Se pueden ver con mejor detalle los grupos axonales en regeneración, con sus células de Schwann envolviendo los filetes axonales y el endoneuro entre axón y axón.

Figura 36. Nervio peroneo de la rata del grupo 2



Corte transversal del nervio peroneo, con tinción con azul de toluidina de la rata del grupo 2 (neurorrafia + MCB y PRFC) al día 90 de la intervención. (A): aumento de 10x. B: Aumento de 100 x; recuadro amarillo: unidades en regeneración, constituido por filetes axonales mielínicos y su célula de Schwann.

Tabla 8. Tabla comparación de complicaciones de los individuos expuestos a MCB con o sin PRFC y no expuestos

GRUPO	Complicaciones		Total
	No	Si	
<i>Cirugía simulada*</i>	2 100%	0 0%	2 100%
<i>Expuestos a MCB con o sin PRFC**</i>	11 69%	5 31%	16 100%
<i>Neurorrafia (estándar***)</i>	4 80%	1 20%	5 100%
<i>Total</i>	17 73,91%	6 26,09%	23 100%
<i>Prueba Fisher's exact del grupo 1 al 3 vs grupo 4 y 5: p = 1.000</i>			

*Grupos 5. ** Grupo 1, 2 y 3. ***Grupo 4.

Si se hace la comparación solo de los sujetos intervenidos con MCB con o sin PRFC vs los manejados con el tratamiento estándar (grupo 4, es decir el grupo control) se evidencia que los sujetos intervenidos presentan más complicaciones, sin embargo, tampoco es estadísticamente significativa la diferencia (Prueba 1- sided Fisher's exact: $p = 0,550$) (Tabla 9).

Tabla 9. Tabla comparación de complicaciones de los individuos expuestos a MCB con o sin PRFC y el estándar

GRUPO	Complicaciones		Total
	No	Si	
<i>Expuestos a MCB con o sin PRFC**</i>	11 69%	5 31%	16 100%
<i>Neurorrafia (estándar***)</i>	4 80%	1 20%	5 100%
<i>Total</i>	15 71,43%	6 28,57%	21 100%
<i>Prueba Fisher's exact : p = 1.000</i>			
<i>Prueba 1- sided Fisher's exact del grupo 1 al 3 vs grupo 4: p = 0,550</i>			

** Grupo 1, 2 y 3. ***Grupo 4.

Tabla 10. Complicaciones

		Grupo 1	Grupo 2	Grupo 3	Grupo 4	Grupo 5	p
Cambios inflamatorios	No	5 100%	6 100%	5 100%	5 100%	2 100%	-
	Sí	0 0,00%	0 0,00%	0 0,00%	0 0,00%	0 0,00%	
Dehiscencia	No	5 100%	4 66,67%	5 100%	4 80%	2 100%	Fisher's exact = 0.675
	Sí	0 0,00%	<u>2</u> <u>33,33%</u>	0 0,00%	<u>1</u> <u>20%</u>	0 0,00%	
Automutilación	No	5 100%	3 50%	3 60%	5 100%	2 100%	Fisher's exact = 0.169
	Sí	0 0,00%	<u>3</u> <u>50%</u>	<u>2</u> <u>40%</u>	0 0,00%	0 0,00%	
Cambios de comportamiento (agresividad)	No	5 100%	5 83,33%	5 100%	5 100%	2 100%	Fisher's exact = 1.000
	Sí	0 0,00%	<u>1</u> <u>16,67%</u>	0 0,00%	0 0,00%	0 0,00%	
Hematoma	No	5 100%	5 83,33%	5 100%	5 100%	2 100%	-
	Sí	0 0,00%	<u>1</u> <u>16,67%</u>	0 0,00%	0 0,00%	0 0,00%	
Mortalidad	No	5 100%	6 100%	5 100%	5 100%	2 100%	-
	Sí	0 0,00%	0 0,00%	0 0,00%	0 0,00%	0 0,00%	

11. Discusión:

La recuperación del nervio periférico ante una lesión severa de grado Sunderland V sigue siendo un reto terapéutico, aunque se realice el tratamiento estándar, es decir la neurorrafia, no se logra la recuperación completa. Por esta razón muchos científicos se han enfocado en el desarrollo y aplicación de diferentes dispositivos en un intento de mejorar el pronóstico de este tipo de lesiones. En este estudio se aplicó un biomaterial natural asociado a factores de crecimiento como tratamiento complementario a la neurorrafia.

El estudio se diseñó aplicando la MCB y el PRFC en una población homogénea en sus características biométricas, la cual se dividió en varios grupos de intervención como se explica en la **(Tabla 4)**.

El efecto de la intervención se evaluó midiendo la recuperación motora mediante el IFC, después de la sección completa del NC. Donde se observó que la recuperación es mejor cuando se hace la neurorrafia epiperineural complementada con aplicación de MCB, comparada con neurorrafia epiperineural como único tratamiento. La recuperación motora obtenida en el caso de adicionar además PRFC fue aún mejor **(Tabla 6) (Figura 26)**, aunque no hay otros estudios que comparen el uso de la MCB y el PRFC en la neurorrafia, estos resultados son concordantes con estudios donde se muestra un efecto benéfico de la aplicación de PRFC en neurorrafia para la regeneración nerviosa (15,16,18,64–66). Sin embargo, los datos vistos al final del estudio muestran que aplicar solo la MCB sin hacer neurorrafia, no produce ningún efecto positivo sobre la recuperación motora, si se compara con la neurorrafia como único tratamiento, al ser evaluado con el IFC.

Lo obtenido al respecto de la recuperación motora asociada a la MCB va en contraposición al hallazgo de los estudios de Kowalska et al (13) y Binnetoglu et al(67), quienes no encontraron ninguna diferencia entre el grupo control y los expuestos a la MCB, sin embargo, ambos estudios recalcan que el resultado podría estar relacionado las características del diseño de cada estudio.

Otra forma como que se quiso comprobar el efecto de la intervención, fue la evaluación de la regeneración nerviosa con estudios de histología. En este caso, se encontró mayor regeneración nerviosa en los individuos expuestos a la MCB, aunque no hubo significancia estadística. Pero esta afirmación es la misma comprobada por Binnetoglu et al(67), en lesiones del nervio facial de ratas Sprague Dawley.

El mismo resultado tuvieron los animales a los que se les adicionó el PRFC (grupo 2) a la MCB, algo no evaluado previamente en otros estudios. Sin embargo, en estudios donde aplican PRFC asociado o no a otros neurotubos, también se ha visto efectos positivos sobre la regeneración nerviosa, en comparación a los tratamiento estándar (18,64,66).

En cuanto a los signos de inflamación nerviosa como indicativo del proceso de cicatrización en los hallazgos histológicos, se vio que la aplicación de la membrana junto a la neurorrafia (grupo 1), produjo menor respuesta inflamatoria, en comparación con los demás grupos. Por otra parte, el grupo que más tuvo respuesta inflamatoria del nervio fue el que se expuso tanto a la MCB como al PRFC (grupo 2). Dejando el interrogante sobre si la obtención del plasma de forma heteróloga influye en el aumento de respuesta inflamatoria. Aparte de esto, se encontró que el grupo control, de solo neurorrafia, también presentó signos de inflamación en el nervio. Por lo que no aclara si realmente la aplicación de la MCB y el PRFC puede tener relación con la aparición de respuesta inflamatoria en el nervio. Algo que posiblemente se podría responder si se continua el experimento en poblaciones más grandes. Lo reportado en la literatura por Binnetoglu et al(67), sobre la aplicación de la CB en relación con signos de inflamación del nervio evaluados en términos de fibrosis, también encontró que el asociar la CB a la neurorrafia (como el grupo 1 de nuestro estudio) produce menos fibrosis, que solo usar la CB sin neurorrafia.

También se hizo la evaluación de neuroma como otro indicador del proceso de cicatrización, donde se encontró que el exponer o no al animal a la membrana con o sin plasma, va a producir la misma cantidad de neuroma al grupo control, excepto cuando se usa la MCB, pero no se hace neurorrafia, pues es el único grupo que produjo neuroma en el 100% de los individuos. Sin poder determinar la significancia estadística, por la cantidad de datos obtenidos.

Este resultado es contrario a lo reportado por Kowalska et al (13) y Binnetoglu et al(67) pues reportan menos neuroma en los grupos expuestos a la membrana, a pesar de que Kowalska et al (13) no practica neurorrafia en sus ratas. Sin embargo, hay que tener en cuenta que la definición histológica del neuroma que ellos plantean es diferente a la planteada en este estudio. Algo que se superaría si en estudios futuros se unifican las definiciones.

Una de las preguntas que se tenía era saber que cambios sufría la MCB en un microorganismo vivo, por ello quisimos evaluar si se lograba apreciar la membrana a lo largo del estudio, cuyo resultado fue que estaba presente en todas las ratas expuestas a neurorrafia + MCB con o sin PRFC. Pero llamativamente en el grupo 3 de solo membrana, ésta estuvo presente en el 80% de los animales. Igualmente, en el grupo control de solo neurorrafia, el patólogo reporto membrana en el 40% de los individuos. Se cree que la causa de estas observaciones es que la evaluación histológica es una prueba subjetiva, que puede estar influenciada por la cantidad de tejido presente en la lámina de histología y la posición del tejido cuando se realiza el corte durante su preparación. Debido que solo se analizó una lámina histológica por cada rata, posiblemente en ese corte de tejido, no quedo la membrana para el caso del grupo 3; o quedó otro tejido que en su configuración es parecido a la apariencia de la membrana, para el caso del grupo control. A pesar de esto, en el trabajo de Lima et al.(68), se concluye que la CB tiene algún grado de absorción. Por ello se deben realizar futuros estudios donde se evalúen todas laminas histológicas que se puedan obtener de toda la muestra, para poder sacar conclusiones más claras respecto a este aspecto.

Así mismo, al intentar responder la pregunta de si hubo respuesta inflamatoria asociada a la membrana en el caso de estar presente, se encontró que el 40% de los individuos del grupo 1 (neurorrafia + MCB) y grupo 2 (neurorrafia + MCB + PRFC) presentaron una respuesta

inflamatoria leve; y para el grupo 3 (membrana sola) el 60%, de los 4 individuos a los que se le vio membrana, también presentó la respuesta inflamatoria de forma leve. En cuanto al grupo control, cuyo caso dio falsos positivos para la presencia de membrana, no presentó inflamación asociada a esta como era de esperar. Estos resultados dejan ver que de cierta forma la membrana induce algún tipo de respuesta inflamatoria en un organismo vivo, sea asociada o no al PRFC. Este hallazgo es concordante con lo reportado por Lima et al(68), quienes también encontraron algún tipo de respuesta inflamatoria asociada a la membrana en la evaluación histológica, sin que esto afectara su biocompatibilidad cuando se usa para reparar defectos de la duramadre en ratas.

Klemm et al (11), en su trabajo también describe encontrar la CB cubierta con tejido conectivo y vasos sanguíneos, pero sin presencia de fibrosis o encapsulamiento, a la evaluación clínica.

Una forma como se decidió evaluar la seguridad de la MCB y el PRFC, fue mirando el posible daño tisular o efecto inflamatorio en otros órganos. Encontrando 1 granuloma incompleto y trombosis arterial a nivel del pulmón, de 1 individuo del grupo 3 y del grupo control respectivamente. También se vio respuesta puesta inflamatoria de las triadas portales en otro individuo del grupo 1. Según lo considerado por el patólogo, estos hallazgos no representaban cambios significativos, como para considerarlos enfermedad secundaria a la exposición de la MCB o el PRFC. Al revisar la literatura que efecto produce la CB sistémicamente, no se encontró ningún estudio que evalúe este aspecto.

Otro aspecto que permite hablar de la seguridad es determinar las complicaciones valoradas clínicamente, secundarias a la exposición de la MCB con o sin PRFC. En este sentido, se pudo evidenciar que no hay ningún caso de mortalidad asociado. Adicionalmente el grupo que presentó más complicaciones fue el grupo 2 (expuesto a la MCB y el PRFC), pero también hubo complicaciones en el grupo 3 (expuesto a MCB sin neurorrafia) y el grupo control, es decir el

grupo 4, que no estaba expuesto a la MCB, ni a el PRFC. Pero no hubo diferencias estadísticamente significativas en estos resultados.

En el caso de la automutilación se encontró coincidencias con lo observado por Kowalska et al(13), quienes tampoco tuvieron esta complicación en el grupo control, pero sí en los individuos expuestos a la MCB. Aunque también hay que resaltar que uno de nuestros grupos expuestos a la membrana (grupo 1) no la presentó. Otro resultado que llama la atención es que éste mismo grupo de solo neurorrafia + MCB, no tuvo ninguna otra complicación. Por lo que es difícil definir si hay una relación entre la presencia de la MCB con las complicaciones. Kowalska et al (13), en su estudio relaciona el hallazgo de mayor mutilación en los individuos expuestos a la membrana con el aumento de la concentración de factores neurotróficos dentro del tubo de MCB.

Como ya se mencionó previamente, también queda el interrogante si el hecho que el PRFC, no es de origen autólogo, tenga alguna relación con la presencia de complicaciones y respuesta inflamatoria a la membrana, debido que el grupo que tuvo la mayor cantidad de estos resultados fue el grupo 2 (MCB + PRFC). Sin embargo, este método de obtención del plasma se planteó en base del estudio realizado por Minn et al(64), que también obtuvo el PRFC a partir de una rata donante. Aunque hay que aclarar que ellos no evaluaron las complicaciones.

Otro aspecto para mencionar son las fortalezas del estudio. La primera es haber organizado la población en los 5 grupos explicados en (**Tabla 4**), pues permitió evaluar el efecto de la MCB asociada o no al PRFC, y el efecto sobre la neurorrafia, pero también cuando no se practica esta. Adicionalmente, el hecho que no solo se hicieron las comparaciones con el grupo control, sino que también se pudo contrastar todos los resultados con una rata sin lesión. Dio la

posibilidad de evaluar cuales son los cambios producidos con una intervención real, especialmente en las pruebas histológicas.

Adicionalmente, otra fortaleza del estudio es poder evaluar el efecto esperado a las intervenciones desde diferentes aspectos, no solo de forma clínica, sino también de forma histológica, aplicando técnicas de HE y de MOAR.

También, el hecho de aplicar una MCB, producida localmente, de bajo costo. Que, al demostrar sus ventajas en la aplicación clínica, se convierte en un recurso altamente valioso en nuestra población.

Pero también tuvimos dificultades que son importantes mencionar, como la pequeña cantidad de individuos evaluados, un seguimiento en el tiempo posiblemente insuficiente para ver todos los cambios del proceso de reinervación. Igualmente tuvimos dificultades en la técnica para procesar las muestras para los estudios de histología, ya que era difícil posicionar el tejido adecuadamente en los bloques de parafina para su corte, por el pequeño tamaño que tiene el NC, adicionalmente al agotamiento de la muestra de la misma rata, para hacer más estudios.

12. Conclusiones:

El estudio realizado sugiere que la aplicación de la MCB con o sin PRFC en las neurorrafias terminales tienen un efecto positivo en la recuperación motora y en la regeneración nerviosa de las ratas con lesión del nervio ciático. Además, cuando la MCB no se asocia a neurorafia también tiene una mejor recuperación motora inicialmente, y presenta igual regeneración nerviosa que los otros grupos expuestos.

En cuanto la evaluación de la seguridad, que es otro de los objetivos principales de este estudio. Se concluye, que exponer a las ratas Wistar a la MCB con o sin PRFC no produce desenlaces fatales, pues no hubo casos de mortalidad. Adicionalmente no genera enfermedades en otros órganos. Pero, cuando se habla de otras complicaciones, consideradas como menores, se evidenció que hay la tendencia de presentar mayor porcentaje de éstas en los grupos expuestos en comparación al grupo control, sin tener diferencias estadísticamente significativas.

Al evaluar los resultados producidos sobre la cicatrización, no se encontró algún efecto protector o no, de la MCB asociada o no al PRFC sobre la producción de neuroma. Pero cuando se evalúa los signos de inflamación nerviosa, se produce menos inflamación si solo se asocia la neurorrafia a la MCB y no al PRFC. Pero se debe recalcar que aplicar el tratamiento estándar también se produce respuesta inflamatoria del nervio.

Adicionalmente, se confirmó que la MCB usada en este estudio no se biodegrada en un organismo vivo. Además, produce una respuesta inflamatoria leve, en el mismo porcentaje que en el caso de asociarla al PRFC.

Dado que no se encontraron diferencias estadísticamente significativa o no se pudieron calcular por la poca cantidad de datos. Se recomienda realizar más estudios con poblaciones más grandes, y con seguimiento más largo para encontrar diferencias estadísticamente significativas para reafirmar estas hipótesis.

13. Alcances y Potenciales Beneficios del Trabajo de Grado

13.1. Con respecto al desarrollo del trabajo colaborativo:

- Afianzó el trabajo científico colaborativo entre diferentes grupos de investigación, escuelas y facultades de la UIS.
- Se fortaleció la línea de investigación experimental de los grupos GIFTEX y CEIAM al trabajar en conjunto con diferentes proyectos con el grupo GRICES.
- Se fortaleció la investigación interdisciplinaria al servicio de la salud y la comunidad.

13.2. Con respecto al desarrollo de tecnologías:

- Se propuso la aplicación de la neurorrafia asociada a la implantación de biomembrana de celulosa bacteriana y factores de crecimiento derivados de plaquetas, como una nueva tecnología que mejora los resultados clínicos de los pacientes cuando se compara con los procedimientos hasta ahora aplicados como la neurorrafia.

13.3. Dirigidos a la apropiación social y circulación del conocimiento:

- Se probó un dispositivo con impacto en la mejoría en la reinervación de lesiones de nervio periférico en nuestros pacientes.
- Se presentó el proyecto de investigación como ponencia de trabajo libre en un congreso nacional y otro internacional, generando difusión del conocimiento científico.
- Publicación de los resultados obtenidos en alguna revista científica indexada de categoría A o B u homologada B por Colciencias.
- Se innovó en la aplicación de un dispositivo hecho a partir de nuevas técnicas de producción de biomoléculas, generadas con los recursos disponibles en nuestro medio y a bajo costo para su aplicación en la medicina regenerativa. Adicionalmente la aplicación de la celulosa bacteriana en medicina es una fuente potencial del desarrollo

agroindustrial y con un buen impacto medioambiental, al aprovechar el mucilago del cacao (sembrado abundantemente en Santander), que es un desecho agroindustrial, para devolverlo en el ciclo productivo, al usarlo como fuente de carbono en la producción de la celulosa bacteriana.

14. Referencias Bibliográficas

1. Bora FW. A comparison of epineurial, perineurial and epiperineurial methods of nerve suture. *Clin Orthop Relat Res.* 1978;133(133):91–4.
2. Garrido Gómez Juan, Hernández Cortés Pedro, Carriel Araya Sebastián, García García Salomé, Antonio Sáez Moreno José, Alaminos Mingorance Miguel, et al. Tratamiento de las lesiones de los nervios periféricos. Tendencias actuales del tratamiento quirúrgico. *Actualidad Médica.* 2012;97(785):045–55.
3. Mafi P, Hindocha S, Dhital M, Saleh M, P M, S H, et al. Advances of Peripheral Nerve Repair Techniques to Improve Hand Function: A Systematic Review of Literature. Vol. 6, *The Open Orthopaedics Journal.* 2012.
4. Bora FW. Peripheral nerve repair in cats. The fascicular stitch. *J Bone Joint Surg Am.* 1967 Jun;49(4):659–66.
5. Andelković SZ, Lesic AR, Bumbasirevic M, Rasulic LG. The outcomes of 150 consecutive patients with digital nerve injuries treated in a single center. *Turkish Neurosurgery.* 2017;27(2):289–93.
6. Kubiak CA, Kung TA, Brown DL, Cederna PS, Kemp SWP. State-of-The-Art techniques in treating peripheral nerve injury. *Plastic and Reconstructive Surgery.* 2018 Mar 1;141(3):702–10.
7. Clavijo-Alvarez JA, Nguyen VT, Santiago LY, Doctor JS, Lee WPA, Marra KG. Comparison of biodegradable conduits within aged rat sciatic nerve defects. *Plastic and Reconstructive Surgery.* 2007 May;119(6):1839–51.

8. Millán D, Jiménez RA, Nieto LE, Poveda IY, Torres MA, Silva AS, et al. Adjustable conduits for guided peripheral nerve regeneration prepared from bi-zonal unidirectional and multidirectional laminar scaffold of type I collagen. *Materials Science and Engineering C*. 2021 Feb 1;121.
9. Czaja WK, Young DJ, Kawecki M, Brown RM. The future prospects of microbial cellulose in biomedical applications. *Biomacromolecules*. 2007 Jan;8(1):1–12.
10. de Oliveira Barud HG, da Silva RR, da Silva Barud H, Tercjak A, Gutierrez J, Lustri WR, et al. A multipurpose natural and renewable polymer in medical applications: Bacterial cellulose. Vol. 153, *Carbohydrate Polymers*. Elsevier Ltd; 2016. p. 406–20.
11. Klemm D, Schumann D, Udhardt U, Marsch S. Bacterial synthesized cellulose - Artificial blood vessels for microsurgery. *Progress in Polymer Science (Oxford)* [Internet]. 2001;26(9):1561–603. Available from: www.elsevier.com/locate/ppolysci
12. Dary L, Pineda C, Alfonso L, Mesa C, Arturo C, Riascos M. Técnicas de fermentación y aplicaciones de la celulosa bacteriana: una revisión. *Ingeniería y Ciencia* [Internet]. 2012;8(16):307–35. Available from: <http://www.eafit.edu.co/ingciencia>
13. Kowalska-Ludwicka Karolina, Cala Jaroslaw, Grobelski Bartlomiej, Sygut Dominik, Jesionek-Kupnicka Dorota, Kolodziejczyk Marek, et al. Modified bacterial cellulose tubes for regeneration of damaged peripheral nerves. *Archives of Medical Science*. 2013 Jun;9(3):527–34.
14. Binnetoglu A, Demir B, Akakin D, Kervancioglu Demirci E, Batman C. Bacterial cellulose tubes as a nerve conduit for repairing complete facial nerve transection in a rat model. *European Archives of Oto-Rhino-Laryngology*. 2020 Jan 1;277(1):277–83.

15. Bastami F, Vares P, Khojasteh A. Healing effects of platelet-rich plasma on peripheral nerve injuries. *Journal of Craniofacial Surgery*. 2017;28(1):e49–57.
16. Sariguney Y, Yavuzer R, Elmas C, Yenicesu I, Bolay H, Atabay K. Effect of platelet-rich plasma on peripheral nerve regeneration. *Journal of Reconstructive Microsurgery*. 2008 Apr;24(3):159–67.
17. Roque JS, Pomini KT, Buchaim RL, Buchaim DV, Andreo JC, Roque DD, et al. Inside-out and standard vein grafts associated with platelet-rich plasma (PRP) in sciatic nerve repair. A histomorphometric study. *Acta Cirurgica Brasileira*. 2017;32(8):617–25.
18. Sorrenti-Pírez N, Fossati-Cola S, Fossati G. Estudio preliminar experimental en ratas: uso de plasma rico en plaquetas en el tratamiento de lesiones agudas de nervios periféricos. *Cirugia Plastica Ibero-Latinoamericana*. 2016 Apr 1;42(2):131–40.
19. Daniel, Duran; Cabezas J, Combariza M. Evaluación del mucílago de cacao como fuente de carbono para la producción de celulosa bacteriana [Internet] [TESIS (PREGRADO)]. *Semana Internacional de la Ciencia: Retos para el siglo XXI*. UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER; 2019. Available from: <http://200.16.118.211/index.php/semanainterciencia/seminterciencia/paper/view/205>
20. Florez I, Combariza M, Blanco C. Producción de celulosa bacteriana a partir de procesos de fermentativos utilizando mucílago del café como fuente de carbono [Tesis (Posgrado)]. Universidad Industrial De Santander.; 2015.
21. Ditty BJ, Omar NB, Rozzelle CJ. Surgery for Peripheral Nerve Trauma. In: *Nerves and Nerve Injuries*. Academic Press; 2015. p. 373–81.

22. Castillo, Marina; Martínez, Maximiliano, de la Garza Óscar; Elizondo, Rodrigo, Guzman S. Estudio de la lesión nerviosa periférica en pacientes atendidos por traumatismos. *Gaceta Médica de México*. 2014;150(6):527-532.
23. Jobe, Mark; Martinez, Santos; Weller W. Peripheral Nerve Injuries. In: *Campbell's Operative Orthopaedics*. Elsevier; 2021. p. 3282.
24. Hoyos Juan, Melendez G. Trauma Abierto de Mano. Estudio de Cohorte [Tesis (Especialista en cirugía plástica: reconstructiva y estética)]. Universidad Industrial de Santander; 2019.
25. Lee SK, Wolfe SW. Peripheral nerve injury and repair. [Internet]. Vol. 8, *The Journal of the American Academy of Orthopaedic Surgeons*. *J Am Acad Orthop Surg*; 2000 [cited 2022 May 30]. p. 243–52. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10951113/>
26. Torres Yenifer. Caracterización de Biomasa Lignocelulósica (*Theobroma Cacao L*) Para su Uso en la Obtención de Etanol por Vía Fermentativa [Trabajo de Grado a título de Química Ambiental]. Universidad Santo Tomás.; 2016.
27. Moore Keith, Dailey Arthur, Agur Anne. Introducción a la anatomía con orientación clínica. In: *Moore Anatomía con orientación clínica*. Barcelona: Wolters Kluwer Health, S.A., Lippincott Williams & Wilkins; 2013. p. 93–6.
28. Waller A. XX. Experiments on the section of the glossopharyngeal and hypoglossal nerves of the frog, and observations of the alterations produced thereby in the structure of their primitive fibres. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London* [Internet]. 1850 [cited 2022 Jun 15];140:423–9. Available from: <https://lynge.com/en/medicine/48583-experiments-on-the-section-of-the->

glossopharyngeal-and-hypoglossal-nerve-of-the-frog-and-observations-of-the-alterations-produced-thereby-in-the-str/

29. Koeppen AH. Wallerian degeneration: History and clinical significance. In: Journal of the Neurological Sciences [Internet]. J Neurol Sci; 2004 [cited 2022 May 30]. p. 115–7. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15140616/>
30. Gutierrez I. Generalidades y Fisiopatología de la compresión nerviosa. Vol. 10, Orthotips. 2014.
31. Seddon HJ. Three types of nerve injury. Brain [Internet]. 1943 Dec 1 [cited 2022 Jun 15];66(4):237–88. Available from: <https://academic.oup.com/brain/article/66/4/237/323776>
32. de Oliveira Barud HG, da Silva RR, da Silva Barud H, Terejak A, Gutierrez J, Lustri WR, et al. A multipurpose natural and renewable polymer in medical applications: Bacterial cellulose. Vol. 153, Carbohydrate Polymers. Elsevier Ltd; 2016. p. 406–20.
33. Sunderland S. A classification of peripheral nerve injuries producing loss of function. Brain. 1951 Dec;74(4):491–516.
34. Mackinnon SE. Surgery of the peripheral nerve. Carpal tunnel syndrome. 1988;146–69.
35. Millesi H. Microsurgery of Peripheral Nerves. Hand. 1973;5(2):157–60.
36. Rasulic L, Samardzic M. Nerve Grafting Methods. In: Nerves and Nerve Injuries. Academic Press; 2015. p. 237–48.
37. Doi K, Snyder-Warwick A. Nerves. In: Wei FC, Mardini S, editors. Flaps and reconstructive surgery [Internet]. Second Edi. China: Elsevier Inc; 2017. p. 295–309. Available from: <https://www.clinicalkey.es/#!/content/3-s2.0-B9780323243223000249>

38. Griffin JW, Hogan MC v., Chhabra AB, Deal DN. Peripheral nerve repair and reconstruction. *Journal of Bone and Joint Surgery - Series A* [Internet]. 2013;95(23):2144–51. Available from: [http://dx.doi.org/10.1016/S0021-9355\(13\)73959-6](http://dx.doi.org/10.1016/S0021-9355(13)73959-6)
39. Jeong E, Baek RM. Effect of Platelet-rich Plasma(PRP) on Regeneration of Rat Sciatic Nerve in a Silicone Chamber. *J Korean Soc Plast Reconstr Surg* [Internet]. 2010;37(2):105–9. Available from: <https://www.researchgate.net/publication/308076067>
40. Takagi T, Kimura Y, Shibata S, Saito H, Ishii K, Okano HJH, et al. Sustained bFGF-release tubes for peripheral nerve regeneration: Comparison with autograft. *Plastic and Reconstructive Surgery*. 2012 Oct;130(4):866–76.
41. Bharimalla AK, Deshmukh SP, Patil PG, Vigneshwaran N. Energy Efficient Manufacturing of Nanocellulose by Chemo- and Bio-Mechanical Processes: A Review. *World Journal of Nano Science and Engineering* [Internet]. 2015;05(04):204–12. Available from: <http://www.scirp.org/journal/doi.aspx?DOI=10.4236/wjnse.2015.54021>
42. Czaja WK, Young DJ, Kawecki M, Brown RM. The future prospects of microbial cellulose in biomedical applications. Vol. 8, *Biomacromolecules*. 2007. p. 1–12.
43. Hou Y, Wang X, Yang J, Zhu R, Zhang Z, Li Y. Development and biocompatibility evaluation of biodegradable bacterial cellulose as a novel peripheral nerve scaffold. *Journal of Biomedical Materials Research - Part A*. 2018;106(5):1288–98.
44. Fontana JD, de Souza AM, Fontana CK, TORRIANI IL, MORESCHI JC, GALLOTTI BJ, et al. Acetobacter Cellulose Pellicle as a Temporary Skin Substitute. *Applied Biochemistry and Biotechnology*. 1990;24/25:253–64.

45. Yasuda K, Ping Gong J, Yoshinori K, Atsushi N, Yoshie T, Eiji K, et al. Biomechanical properties of high-toughness double network hydrogels. *Biomaterials*. 2005;26(21):4468–75.
46. Roberts EricM, Hardison LindaK, Brown RM. Production of microbial cellulose -. 1968. p. EP 0186495 A3.
47. Yamanaka S, Ono E, Watanabe K. Hollow microbial cellulose, process for preparation thereof, and artificial blood vessel formed of said cellulose [Internet]. European patent. 0 396 344 A3, 1990 [cited 2022 Jun 20]. p. 7. Available from: <https://patentimages.storage.googleapis.com/ab/c9/29/ddfb8ef76f47dd/EP0396344A3.pdf>
48. Yu W, Wang J, Yin J. Platelet-rich plasma: A promising product for treatment of peripheral nerve regeneration after nerve injury. *International Journal of Neuroscience*. 2011;121(4):176–80.
49. Jeong E, Baek RM. Effect of Platelet-rich Plasma(PRP) on Regeneration of Rat Sciatic Nerve in a Silicone Chamber Malarplasty View project Cleft Lip View project [Internet]. Vol. 37, *J Korean Soc Plast Reconstr Surg*. 2010 [cited 2022 Jun 14]. Available from: <https://www.researchgate.net/publication/308076067>
50. Durán Riveros DR, Cabezas Calderón JT, Daniel D, Cabezas J, Combariza M. Evaluación del mucílago de cacao como fuente de carbono para la producción de celulosa bacteriana [Internet] [TESIS (PREGRADO)]. *Semana Internacional de la Ciencia: Retos para el siglo XXI*. UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER; 2019. Available from: <http://200.16.118.211/index.php/semanainterciencia/seminterciencia/paper/view/205>

51. Davis JA. Mouse and Rat Anesthesia and Analgesia. *Current Protocols in Neuroscience* [Internet]. 2008 Jan 1;42(1):A.4B.1-A.4B.21. Available from: <https://doi.org/10.1002/0471142301.nsa04bs42>
52. Removal of blood from laboratory mammals and birds: First Report of the BVA/FRAME/RSPCA/UFAW Joint Working Group on Refinement. *Laboratory Animals* [Internet]. 1993 Jan 1;27(1):1–22. Available from: <https://doi.org/10.1258/002367793781082412>
53. Brown CJ, Mackinnon SE, Evans PJ, Bain JR, Makino AP, Hunter OA, et al. Self-evaluation of walking-track measurement using a Sciatic Function Index. *Microsurgery* [Internet]. 1989 [cited 2022 May 30];10(3):226–35. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/2796719/>
54. Bain JR, Mackinnon SE, Hunter DA. Functional evaluation of complete sciatic, peroneal, and posterior tibial nerve lesions in the rat. *Plastic and Reconstructive Surgery*. 1989 Jan;83(1):129–36.
55. de Medinaceli L, Freed WJ, Wyatt RJ. An Index of the Functional Condition of Rat Sciatic Nerve Based on Measurements Made from Walking Tracks. Vol. 77, *EXPERIMENTAL NEUROLOGY*. 1982.
56. Everitt JI, Gross EA. Chapter 20 - Euthanasia and Necropsy. In: Suckow MA, Weisbroth SH, Franklin CLBTTLR (Second E, editors. *The Laboratory Rat* [Internet]. Second Edi. Burlington: Academic Press; 2006. p. 665–78. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780120749034500236>

57. Perunovic B. Traumatic neuroma [Internet]. PathologyOutlines.com. 2020 [cited 2022 Jun 27]. Available from: <https://www.pathologyoutlines.com/topic/cervixtraumaticneuroma.html>
58. GONZALEZ L. EVALUACION DE LOS EFECTOS DE LA APLICACION, ABSORCION Y DEPOSITO DE BIOPOLIMEROS EN ROEDORES (ALOGENOSIS IATROGENICA) [TESIS (ESPECIALISTA EN CIRUGIA PLASTICA RECONSTRUCTIVA Y ESTETICA)]. Universidad Industrial de Santander; 2018.
59. López Cubas C. Movilización neural para el dolor neuropático - Carlos López Cubas [Internet]. 2014 [cited 2021 Jun 26]. Available from: <https://carloslopezcubas.com/2014/05/movilizacion-neural-para-el-dolor-neuropatico.html>
60. Resolución N. 008430 del 04 de octubre de 1993 del Ministerio de Salud de la República de Colombia. 1993. Report No.: Título V: LA INVESTIGACIÓN BIOMÉDICA CON ANIMALES.
61. Ley 84 de diciembre 27 de 1989, del Congreso de Colombia. Vol. Capítulo V. 1989.
62. Santander UI de. Manual de Bioseguridad [Internet]. Universidad Industrial de Santander. 2012 [cited 2022 Jun 27]. p. 1–24. Available from: <https://www.uis.edu.co/intranet/calidad/documentos/talento humano/SALUD OCUPACIONAL/MANUALES/MTH.02.pdf>
63. Cossio-Bolaños M, Gómez Campos R, Vargas Vitoria R, Tadeu Hochmuller Fogaça R, de Arruda M. Reference curves for assessing the physical growth of male Wistar rats. *Nutricion Hospitalaria*. 2013;28(6):2151–6.
64. Minn K, Jeong E, Chang H, Kwon ST, Kim S, Baek RM. Effect of Platelet-rich Plasma (PRP) on Regeneration of Rat Sciatic Nerve in a Silicone Chamber. *J Korean Soc*

- Plast Reconstr Surg [Internet]. 2010 Mar 1 [cited 2022 Jun 14];37(2):105. Available from: <https://www.researchgate.net/publication/308076067>
65. Melih Şahin M, Cayonu M, Kayalı Dinc S, Ozkocer E, Ilhan M, Uzunoğlu E, et al. Effects of chitosan and platelet-rich plasma on facial nerve regeneration in an animal model. *European Archives of Oto-Rhino-Laryngology* [Internet]. 2021 May 6; Available from: <https://doi.org/10.1007/s00405-021-06859-6>
66. Küçük L, Günay H, Erbaş O, Küçük Ü, Atamaz F, Coşkunol E. Effects of platelet-rich plasma on nerve regeneration in a rat model. *Acta Orthopaedica et Traumatologica Turcica*. 2014;48(4):449–54.
67. Binnetoglu A, Demir B, Akakin D, Kervancioglu Demirci E, Batman C, Dilek Akakin , et al. Bacterial cellulose tubes as a nerve conduit for repairing complete facial nerve transection in a rat model. *European Archives of Oto-Rhino-Laryngology* [Internet]. 2020 Jan 1;277(1):277–83. Available from: <https://doi.org/10.1007/s00405-019-05637-9>
68. Lima F de MT de, Pinto FCM, Andrade-da-Costa BL da S, Silva JGM da, Campos Júnior O, Aguiar JL de A. Biocompatible bacterial cellulose membrane in dural defect repair of rat. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*. 2017 Mar 1;28(3).

APÉNDICES

Apéndice A. Protocolo de condiciones de alojamiento de animales de experimentación en el bioterio.

El departamento de ciencias básicas de la facultad de salud de la Universidad Industrial de Santander cuenta con un bioterio de experimentación. Este lugar, es un laboratorio mixto de reproducción, cría y experimentación cuyo objetivo es: “brindar condiciones ambientales y de manejo adecuado para el bienestar del animal como reactivo biológico con mínimas variables negativas posibles que puedan interferir en los resultados experimentales; así mismo ofrecer al investigador, docente o cualquier ente externo que lo requiera un ambiente adecuado, con la finalidad de evitar que variables ajenas puedan interferir con sus investigaciones” *Rattus norvegicus*. Del animal para garantizar su bienestar, de tal forma que no se altere las variables a estudiar en los proyectos de investigación adelantados en esta población animal.

En el bioterio se reproducen ratas de la línea albina de la especie *Rattus norvegicus* es decir ratas de la cepa Wistar, siguiendo los protocolos avalados por la normatividad vigente.

Este laboratorio cuenta con personal entrenado, un jefe encargado y 2 operarios, quienes se encargan de mantener a los animales en un ambiente controlado, bajo las siguientes condiciones:

- Ciclos de luz y oscuridad de 12 horas de duración respectivamente, cronometradas por un temporizador programable que enciende la luz (fuente fluorescente de 39 W) a las 7 am y la apaga a las 7 pm.
- Ventilación dada por un equipo de aire acondicionado ubicado en el exterior, pero que hace recargas constantes de aire al interior de las salas, bajo presión positiva.

- Una unidad de extractor de olores y vapores en funcionamiento permanente.
- Un termo-higrómetro indicador de temperatura en grados y humedad relativa en porcentaje. La temperatura se mantiene entre 20 y 22 °C y la humedad relativa entre 60 y 70%.
- El alimento se administra a cada animal según el peso, en un horario estandarizado. Los concentrados utilizados son de tipo comercial: finca pollo x 40kg y ringo croquetas x 30kg (productos de finca gro).
- Agua potable a libre consumo, con recambio diario.
- Analgesia durante la primera semana posoperatoria con meloxicam a dosis de 1mg/kg oral cada 12 horas.
- Cajas y rejillas de acero inoxidable con dimensiones 40 x 30 x 17 cm, para alojamiento permanente y cajas plásticas y acrílicas con dimensiones menores, usadas para la copula, gestación y experimentación.
- Se usa cascarilla de arroz como lecho de las camas de los animales.
- Monitoreo de la sala de producción, mínimo 2 veces al día para verificar el adecuado bienestar de los animales y correcto funcionamiento de los equipos.

Apéndice B. Protocolo de preparación de muestras de histología

Gelatinización de láminas:

- Sumergir las láminas portaobjetos limpias en alcohol al 96%.
- Dejar durante unos 25 min.
- Retirar y dejar secar.
- Calentar 1000 ml de agua destilada a 60°C.
- Agregar 10 gr de gelatina.
- 8.81 gr de Kalium Krom (III) sulfato.
- Enfriar a 40°C y filtrar usando papel filtro.
- Introducir durante 2 minutos las láminas portaobjetos en la solución y retirar.
- Dejar escurrir sobre papel filtro.
- Dejar toda la noche en incubadora a 37 – 40°C.
- Enfriar y guardar en refrigeración a 4°C.

Inclusión en Parafina

Selección de la muestra: cada corte debe medir 0.5 cm de tamaño aproximadamente.

1. Deshidratación de la muestra: Etanol

Este paso es necesario puesto que la parafina no es miscible con el agua y por tanto la muestra ha de estar libre de agua.

Primero se sumerge el tejido en PBS: Solución salina tamponada con fosfato o solución buffer fosfato. El PBS se emplea como vehículo neutro para células, ya que no modifica el funcionamiento celular normal, también se emplea para lavar el tejido.

- 3x10 min en solución PBS
- 3x5 min etanol 70°

- 3x5 min etanol 90°
- 3x5 min etanol 90°
- 2x10 min etanol 100°

Solvente Orgánico: Xileno

La parafina tampoco es miscible con el alcohol por lo que se requiere este paso puente con un solvente orgánico. El xileno es miscible con el etanol de 100° y con la parafina.

- 3x5 min xileno (HistoChoice®).
- 60 min parafina I (Parafina líquida en estufa a 60 °C).
- 60 min parafina II (Parafina líquida en estufa a 60 °C).
- 60 min parafina III (Parafina líquida en estufa a 60 °C).

Encastrar en parafina y hacer el bloque.

Colocar parafina líquida en un molde metálico, fuera de la estufa, e introducir la muestra en él con la orientación deseada.

Dejar enfriar a temperatura ambiente por 2 minutos y refrigerar para retirar el molde metálico.

Desparafinización

Los bloques de parafina se deben dejar toda la noche en el horno a 60° C, para retirar la parafina.

Colocar las láminas en una rejilla y realizar los siguientes lavados:

1. HistoChoice®: 2 lavados x 3 minutos luego.
2. HistoChoice®: Etanol absoluto 100° (1:1): un lavado 3 minutos luego.
3. Etanol absoluto: 2 lavados x 3 minutos luego.
4. Etanol al 96%: un lavado 3 minutos luego.

5. Etanol al 70%: un lavado 3 minutos.

Inclusión de tejidos en resina Spi-Pon®

1. Realizar un lavado del tejido con agua destilada por 5 minutos para quitar el exceso de fijador.
2. Para la post fijación sacar con una jeringa el agua destilada del lavado y adicionar al tubo Tetraoxido de Osmio al 1% por 2 horas.
3. Pasadas las dos horas, comenzar la deshidratación:
 - Alcohol al 50° x 10 minutos, luego.
 - Alcohol al 70° x 10 minutos, luego.
 - Alcohol al 90% x 10 minutos, luego.
 - Alcohol al 100% 2 lavados x 10 minutos, luego.
 - Alcohol-acetona (1:1) x 15 minutos.
 - Finalizar con acetona 100% x 15 minutos.
4. Luego de la deshidratación se inicia el proceso de inclusión en resina, para ello se debe retirar la acetona 100% del último paso de la deshidratación y continuar de la siguiente manera:
 - Sumergir en una solución de resina Spi Pon® 812 / Acetona (1:2) x 1 hora
 - Retirar esta solución
 - Sumergir en una solución de resina Spi Pon® 812 / Acetona (1:1) x 1 hora
 - Retirar la solución anterior
 - Sumergir en una solución de resina Spi Pon® 812 pura x 2 horas

- Finalmente, las muestras se colocan en moldes de silicona con resina Spi Pon® 812 pura y se llevan al horno a 60°C x mínimo 18 horas para polimerizar.

Preparación resina Spi Pon® 812

Para 100 mililitros de resina adicionar los volúmenes de reactivos en el siguiente orden:

1. 45,45 ml de Spi Pon® 812
2. 28,11 ml de DDSA
3. 25,03 ml de NMA
4. 1,40 ml de catalizador DMP-30

Preparación Tetraóxido de osmio 2 % (0.25gr)

1. Lavar un frasco ámbar con agua destilada y dejar secar muy bien en el horno.
2. Adicionar 12,5 ml de agua destilada ultrapura.
3. Con cuidado y evitando la manipulación excesiva romper la ampolla de osmio e introducirla en el frasco (romperla por la línea resaltada en la zona más delgada de la ampolla).
4. Sellar la tapa del frasco con plástico Parafilm®
5. Tapar el frasco y dejar que el agua entre en la ampolla
6. Forrar el frasco con papel aluminio
7. Almacenar en refrigeración

Nota: Para el proceso de deshidratación-inclusión mantener los tejidos en un tubo Eppendorf® de 3 ml (dependiendo del tamaño del tejido) con el fin de evitar la manipulación excesiva de estos y adicionar/retirar cada reactivo del tubo.

Coloración con Azul de Toluidina

Preparación:

Disolver el Bórax en el agua destilada, luego agregar el colorante, mezclándolo con agitación constante por 5 minutos, envasarlo en botellas oscuras y, por último madurar esta solución madre por 24 horas a 37°C. Almacenar a temperatura ambiente en un lugar oscuro. La solución de trabajo se envasa en frascos con gotero de volúmenes pequeños para uso diario.

Técnica de coloración:

- Cortes de 1-1,5 micras de grosor.
- Secado de cortes en plancha caliente o incubadora a 55-60°C por 30-60 minutos.
- Adicionar gotas de colorante hasta cubrir completamente el tejido.
- Calentar las láminas sobre una plancha caliente a 55-60°C, hasta que aparezca un halo refringente en la periferia de la gota del colorante.
- Retirar la lámina del calor y esperar 10 segundos y lavar con agua corriente por 5 minutos.
- Secar a temperatura ambiente, aclarar y colocar el cubreobjetos con medio de montaje.

Apéndice D. Presupuesto

RUBRO	GASTOS (Pesos Colombianos)	FUENTES
Insumos y suministros		
Ratas del bioterio, mantenimiento y cuidado (23 unidades) 30.000 pesos unidad.	690.000	Investigador
Kit De Campos Quirúrgicos Estériles Desechables: - 50 X 50 Cm #40 (12.000 Pesos Unidad)	480.000	Investigador
Insumos - Jabón Quirúrgico - Gafas De Protección - Batas Desechables - Tapabocas - Gorros Desechables - Polainas Desechables - Guantes Limpios - Guantes Estériles - Gasas - Apósitos Pequeños - Compresas - Aplicadores - Cuchillas De Bisturí - Frascos De Rotulación Para Patología - Jeringas De 5cc - Jeringas De 10cc - Esparadrapo	600.000	Investigador
Anestésicos Intravenosos: - Ketamina #6 - Xylazina #6 *(Las Cuales Según Bioterio Son Suficientes Para Toda La Población)	400.000	Investigador *Compra Por Medio Del Bioterio UIS
Suturas: Sutura Nylon 9-0 Caja Por 12 #1 (\$146310 Pesos Unidad) - Prolene 5-0 #50 Valor Unidad \$6200	456.000	Investigador
Instrumental quirúrgico y microquirúrgico:	0	Investigador

Microtubos De Ensayo Con EDTA 300000, Caja Por 100	300.000	Investigador
Biomembrana De Celulosa Bacteriana	0	Por Grupos de Investigación GIFTEX Y CEIAM
Micropipeta Automática 1000ul A 5000ul Pipeta Laboratorio	180.000	Investigador
Kit De Aseo: - Detergente En Polvo - Cepillos - Toallas Absorbentes - Papel Cartón	150.000	Investigador
Kit De Marcación Quirúrgica: Azul De Metileno Marcadores Finos	50.000	
- Preparación de láminas de histología	3'000.000	Investigador
Lupas Microquirúrgicas	0	Investigador
Computadores #2	0	Particulares
Cámara Fotográfica #1	0	Particular
Software De Análisis Estadístico	800.000	Investigador
Impresora	0	Investigador
Artículos Bibliográficos	0	Biblioteca Física y Virtual UIS
Gastos del personal		
Hora Microbióloga 2 Horas Semanales Por 3 Semanas	72.000	Uis
Hora Patólogo (18.000 Pesos/Hora) 6 Horas Semanales Por 12 Semanas	1'296.000	UIS
Hora Tutor (18.000 Pesos/Hora) 2 Horas Semanales Por 36 Meses (156 Semanas): # Dos Tutores	11'232.000	UIS

Hora Docente Epidemiología (18.000 Pesos/Hora) 2 Horas Semanales Por 12 Meses (48 Semanas)	1'728.000	UIS
Hora Investigador (10.000 Pesos/Hora) 2 Horas Semanales Por 48 Meses (208 Semanas)	4'160.000	Investigador
Pasarela Para Evaluación Clínica	300.000	Investigador
Hora Patólogo Participación Ad Honorem	0	UIS
Viajes		
Viaje nacional e internacional: Tiquetes, viáticos	4'000.000	UIS
TOTAL: \$29'894.000		