



Regeneración de nervio periférico en ratas utilizando matriz de fibrina con medios condicionados de células madre mesénquimales

Lina Marcela Erazo Acosta

Universidad Nacional de Colombia
Facultad de Medicina, Departamento de Cirugía
Unidad de Ortopedia y Traumatología
Bogotá, Colombia
2017

Regeneración de nervio periférico en ratas utilizando matriz de fibrina con medios condicionados de células madre mesénquimales

Lina Marcela Erazo Acosta

Trabajo presentado como requisito para obtener el título en
Especialista en Ortopedia y Traumatología.
Tutor: Dr. Enrique Vergara Amador

Universidad Nacional de Colombia
Facultad de Medicina, Departamento de Cirugía
Unidad de Ortopedia y Traumatología
Bogotá, Colombia
2017

TABLA DE CONTENIDO

ESQUEMA DE PRESENTACIÓN	4
RESUMEN	5
JUSTIFICACIÓN	7
PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN	9
OBJETIVO GENERAL	9
OBJETIVOS ESPECÍFICOS	9
MARCO TEÓRICO	10
LESIÓN DE NERVIOS PERIFÉRICOS.....	10
BIOLOGÍA DE LA REPARACIÓN DE NERVIOS PERIFÉRICOS	10
CÉLULAS MADRE.....	11
LAS CÉLULAS MADRE MESENQUIMALES (MSCs).....	12
LAS CÉLULAS MADRE MESENQUIMALES Y REGENERACIÓN NERVIOSA	12
EFECTO PARACRINO DE LAS MSCs.....	13
MEDIOS CONDICIONADOS (MC).....	13
USOS Y FORMAS DE EMPLEO DE LOS MC	13
MODELOS DE LESIÓN DE NERVIOS PERIFÉRICOS EN ANIMALES	13
METODOLOGÍA	14
TIPO DE ESTUDIO	14
TIPO DE MUESTRA.....	14
TAMAÑO DE LA MUESTRA.....	14
MATRIZ DE FIBRINA	14
CÉLULAS MADRE MESENQUIMALES HUMANAS	14
MEDIOS CONDICIONADOS.....	14
MATRIZ DE FIBRINA CON CÉLULAS MADRE MESENQUIMALES.....	15
MATRIZ DE FIBRINA CON MEDIOS CONDICIONADOS DE MSCs.....	15
PROCEDIMIENTO QUIRÚRGICO	15
REGISTRO DE ELECTROMIOGRAFÍA	15
OBTENCIÓN DE MUESTRAS.....	16
CRITERIOS DE EVALUACIÓN Y SEGUIMIENTO.....	16
ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....	16
RESULTADOS	15
COMPLICACIONES	17
CONCLUSIONES	18
CONSIDERACIONES ÉTICAS	189
PROPIEDAD INTELECTUAL	189
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	20
ANEXOS	25

ESQUEMA DE PRESENTACIÓN

TITULO DEL PROYECTO	Regeneración de nervio periférico en ratas utilizando matriz de fibrina con medios condicionados de células madre mesénquimales				
INVESTIGADOR PRINCIPAL	Nombre	Lina Marcela Erazo Acosta ¹			
	Teléfono fijo				
	Teléfono celular	3163076264			
	Correo electrónico	gogoliza22@gmail.com			
COINVESTIGADOR	Nombre	Orlando Chaparro Garzón ²			
	Teléfono fijo	316500. Ext 15057/9			
	Teléfono celular	311 222 1717			
	Correo electrónico	ochaparrog@unal.edu.co			
COINVESTIGADOR	Nombre	Enrique Vergara Amador ³			
	Teléfono fijo	316 5000 ext. 15107			
	Teléfono celular	316 410 6358			
	Correo electrónico	enriquevergaramd@gmail.com			
COINVESTIGADOR	Nombre	Daniel Enrique Vega Lizarazo ⁴			
	Teléfono fijo				
	Teléfono celular	3006113960			
	Correo electrónico	cowinsaint@gmail.com			
TIPO DE VINCULACIÓN	Contrato directo	Convenio Docente-Servicio	<input checked="" type="checkbox"/>	Institución educativa	<input checked="" type="checkbox"/>
ASESORES	Dra. Lucia Botero Espinosa, Dr. Jorge Arturo Díaz ⁵				
MOTIVACIÓN DE INVESTIGACIÓN	Requisito para título profesional	Requisito para título de Postgrado	<input checked="" type="checkbox"/>	Investigación independiente	<input checked="" type="checkbox"/> Otro ¿Cuál?

¹ Residente IV año. Ortopedia y Traumatología Universidad Nacional de Colombia.

² BSc en Biología, MSc en Genética Humana, Universidad Nacional de Colombia - PhD en Ciencias Biomédicas, The Mount Sinai School Of Medicine, Nueva York, Estados Unidos

³ Especialista en Ortopedia y Traumatología, Universidad Nacional de Colombia - Cirujano de Mano, Miembro Superior y Microcirugía, Universidad Pierre y Marie Curie, Instituto Francés de la Mano, Paris, Francia - Profesor de ortopedia infantil. Unidad de Ortopedia y Traumatología - Facultad de Medicina de la Universidad Nacional de Colombia

⁴ Médico Cirujano. Universidad Nacional de Colombia

⁵ Médico especialista en Medicina Física y Rehabilitación, Profesor Titular Universidad Nacional de Colombia. Director Médico CIFEL – Bogotá

RESUMEN

Las lesiones de nervio periférico son alteraciones causadas en su mayoría por traumas mecánicos que alteran la capacidad axonal del nervio de transmitir impulsos tanto sensitivos como motores, lo que genera severa discapacidad física en los pacientes, alteraciones en su calidad de vida y en su actividad económica. El tratamiento convencional en algunas ocasiones no puede superar las limitaciones fisiológicas de recuperación en cuanto a velocidad de regeneración y restablecimiento de la funcionalidad, debido al mecanismo de trauma o la brecha generada en el nervio, por eso se han explorado diferentes opciones como la terapia celular y el uso biomateriales, con resultados que varían desde un éxito moderado hasta una eficacia nula.

Una alternativa prometedora es el uso de células madre mesénquimales, pues ha demostrado mejorar la velocidad de regeneración axonal y aumentar el grado de mielinización durante el proceso de reparación nerviosa. Sin embargo, recientes estudios científicos parecen indicar que la capacidad neurorregenerativa de las células madre mesénquimales no está basada en una diferenciación a tipos celulares del tejido nervioso, sino más bien en el efecto paracrino que ejercen sobre las células circundantes. Éste efecto paracrino ocurre a través de moléculas biológicamente activas que son liberadas por las células madre al ambiente extracelular y que inician procesos celulares orientados a la reparación del tejido dañado. Las mismas moléculas secretadas por las células madre *in vivo* se pueden encontrar en los medios de cultivo cuando las células son expandidas en el laboratorio y estos se conocen como medios condicionados de células madre mesénquimales. Los medios condicionados no contienen células madre, reduciendo los riesgos del trasplante celular y otorgando facilidades de manejo, disponibilidad y aplicación.

Éste estudio funcional, comparando la eficacia de los medios condicionados en un modelo de lesión de nervio periférico en ratas, muestra una menor alteración del patrón de marcha y mayores cambios electromiográficos en los subgrupos de autoinjerto, medios condicionados y autoinjerto + medios condicionados, sin diferencias estadísticamente significativas entre ellos y con los otros subgrupos.

Palabras clave: Células madre mesenquimales, regeneración nerviosa, medios condicionados, nervio periférico.

ABSTRACT

Peripheral nerve injuries are mostly caused by mechanical trauma, affecting nerve conduction and resulting in a sensory and motor deficit, leading to functional disabilities and economic issues for the patients. Conventional treatment could not be enough for repair sometimes, because of the damaged tissue or nerve gap. As a result, cell investigation and use of many biomaterials for artificial nerve conduits has been explored as alternative treatments.

Mesenchymal stem cells have demonstrated faster recovery and better quality at the nerve fiber. However in the last years has been shown its capability to differentiate into multiple tissue lineages is less important than the paracrine effect on the other cells. This active molecules in the extracellular environment are the beginners of the repair process, and can be found at cellular cultures in the laboratory, called conditioned medium, avoiding immunologic issues and providing easier access than a cell transplant.

This functional study, comparing efficacy of conditioned medium in a peripheral nerve injury in rats, shows less impaired walking and more electrophysiologic changes at autograft, autograft + conditioned medium, and conditioned medium groups, without significant differences with the other groups or between them.

Keywords: Mesenchymal stem cell, nerve repair, conditioned medium, peripheral nerve.

JUSTIFICACIÓN

Las lesiones de nervio periférico son una causa de gran morbilidad en los pacientes afectados [1], ocurriendo desde la infancia, en el mismo momento del nacimiento por un trabajo de parto complicado, hasta las generadas por accidentes de tránsito, irradiación, lesiones eléctricas y por temperaturas extremas.

Estadísticas internacionales reportan que en el 2.8% de las heridas traumáticas puede haber lesión de nervio periférico [2], sin embargo la incidencia varía enormemente en cada país, según la casuística principal.

Debido a la alta incidencia de accidentes de tránsito y los traumas por lesiones personales, en nuestro medio es relativamente frecuente encontrar pacientes que han sufrido lesiones nerviosas con consecuencias tan graves como la pérdida de una función corporal o dolores neuropáticos, disminuyendo notablemente la calidad de vida, generando problemas psicológicos para él y su familia, y creando condiciones de invalidez que afectan su desarrollo personal y profesional.

Esta situación genera un gran impacto económico pues los individuos que se encuentran en edad productiva pierden su capacidad de trabajar, las pensiones por invalidez inician desde temprana edad y los costos de los tratamientos a los que son sometidos para recuperar parte de la función comprometida son elevados.

Dependiendo del origen de la lesión, del tamaño de la brecha, y del compromiso de funciones corporales que conlleve, las alternativas terapéuticas actuales pueden ser insuficientes para lograr una reparación satisfactoria. Aprobados en Estados Unidos por la FDA, comercialmente se pueden adquirir conductos a base de colágeno, en especial colágeno tipo I y III; PGA, que al ser un material poroso presenta procesos de reabsorción a los 6 meses y coprolactona, un poliéster alifático cuya degradación llega a ser completa al año del injerto [3]. Además, se cuenta con pegamentos de fibrina humana [4] como coadyuvantes en la reparación del nervio; sin embargo, su uso está limitado por el costo y la dificultad de adquisición en nuestro medio.

Se ha investigado el uso de diferentes biomateriales [1, 5] que sirvan como soporte para el crecimiento axonal [6-9] y también se han realizado estudios empleando células madre mesénquimales [10, 11], células madre diferenciadas a linajes neurogénicos [8, 12] y proteínas de la matriz extracelular [13], todo esto en busca de una alternativa al uso de autoinjertos cuya obtención puede ser difícil teniendo en cuenta la cantidad y longitud necesaria de la fibra y que dependiendo del sitio donante puede generar un defecto funcional.

En la última década se ha descrito la capacidad de las células madre como potenciales regeneradoras de tejido lesionado y su utilidad en diversas patologías donde la inflamación y la destrucción celular son el problema central [14-16], considerándose que su principal acción residía en la capacidad de multiplicación y diferenciación. No obstante, múltiples ensayos *in vivo* han demostrado que las células madre tienen una baja tasa de implantación y de diferenciación en tejidos lesionados [17] y no contribuyen de manera significativa al volumen celular [18, 19]. Por otro lado, evidencia científica reciente sugiere que las células madre mesénquimales ejercen su función protectora y restaurativa por

efecto paracrino —la secreción al medio ambiente celular de moléculas biológicamente activas— generando cambios fisiológicos sobre las células que la rodean [20-22]. Estas moléculas secretadas se pueden encontrar en los medios donde son cultivadas las células madre y estos se conocen como medios condicionados de células madre mesénquimales.

Esto significa que no es necesario que la célula permanezca en el sitio de la lesión, usando como alternativa el producto de su metabolismo presente en los medios condicionados para obtener resultados similares sin los riesgos inherentes al trasplante de células no diferenciadas y a un menor costo, ya que los medios condicionados no contienen células de ningún tipo, son de fácil obtención y pueden almacenarse de forma que estén disponibles en unos cuantos minutos para su uso, siendo una opción de gran interés para aplicaciones clínicas.

La línea de investigación “Plexo Braquial Y Nervio Periférico, Cirugía De Mano Y Microcirugía” Unidad de Ortopedia y traumatología, trabajando conjuntamente con el grupo de investigación “Biología de Células Madre”, de la Facultad de Medicina de la Universidad Nacional de Colombia, proponen evaluar con el presente estudio la efectividad de los medios condicionados de células madre mesénquimales para regenerar tejido nervioso en un modelo de lesión de nervio periférico, en ratas.

PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN

¿Pueden los medios condicionados de células madre mesénquimales inducir la regeneración nerviosa en un modelo de lesión de nervio periférico en ratas?

OBJETIVO GENERAL

Evaluar la eficacia de los medios condicionados de células madre mesénquimales en la regeneración de nervio periférico en un modelo de lesión nerviosa en ratas.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Comparar el grado de recuperación funcional durante la marcha, en un modelo de lesión de nervio periférico en ratas, tratadas con medios condicionados de células madre mesénquimales vs aquellas tratadas con autoinjerto, células madre o matriz de fibrina.
- Estudiar la respuesta electrofisiológica de la fibra nerviosa en un modelo de lesión de nervio periférico en ratas tratadas con medios condicionados de células madre mesénquimales vs. aquellas tratadas con autoinjerto, células madre o matriz de fibrina.

MARCO TEÓRICO

Lesión de nervio periférico

A diferencia de las alteraciones ocasionadas en el sistema nervioso central, en el nervio periférico existe la posibilidad de regeneración nerviosa [23], dependiendo de la naturaleza y extensión del trauma, del tiempo en que posteriormente se lleve a cabo la reparación [24], y de los requerimientos adicionales que sean empleados para dicho fin.

Sin importar que la lesión sea térmica, química o mecánica, la regeneración dependerá del compromiso de la fibra, ya sea del axón o de las capas que lo recubren, lo que interferirá de distinta manera con las señales enviadas desde el cuerpo neuronal. Sunderland ha descrito 5 grados de lesión [1, 2, 25]:

Grado 1: Neurapraxia, bloqueo de la conducción nerviosa.

Grado 2: Axonotmesis, lesión del axón sin lesión del endoneuro.

Grado 3: Lesión del axón y endoneuro, sin daño del perineuro.

Grado 4: Lesión del funículo, el epineuro mantiene la continuidad.

Grado 5: Lesión del tronco nervioso.

El grado 1 y 2, que corresponden a neurapraxia y axonotmesis, son las de mejor pronóstico, sin embargo a medida que la lesión progresa y compromete el endoneuro, el epineuro y el perineuro, peor es el desenlace.

Biología de la reparación de nervio periférico

Los mecanismos de reparación requieren diferentes procesos y mayor tiempo dependiendo del tipo de lesión que se encuentre, a mayor compromiso de la fibra el proceso inflamatorio será mayor y tomará más tiempo en su reparación, haciendo evidente la alteración de la función neuronal y la hipotrofia muscular secundaria, dando lugar con mayor frecuencia, a conexiones aberrantes y reparación anómala de la fibra.

En la fase inicial del proceso, es posible observar los cambios degenerativos que suceden proximales y distales al sitio de la lesión e incluso cambios identificables en el cuerpo neuronal, como la excentricidad del núcleo, los cambios en el citoplasma y alteraciones en la actividad metabólica de la neurona [2, 26]. La recuperación de estos cambios puede durar de semanas a meses y depende adicionalmente de la adecuada conexión de las fibras periféricas. En un primer momento son las señales generadas desde el cuerpo neuronal en reacción al daño axonal y la degeneración Walleriana [23, 26] las que conducen una respuesta inflamatoria celular y humoral y procesos mediados por calcio. Luego la reparación continua por la proliferación y actividad de células de Schwann [24], generalmente mediada por segundos mensajeros cuya respuesta se evidencia en la transcripción y traducción de proteínas para la regeneración del axón [2] y la formación de bandas de Büngner [27]. Cuando la degeneración axonal es demasiado extensa, las células de Schwann no alcanzan a producir los factores de crecimiento y los componentes de la matriz celular necesarios, entonces la regeneración no se lleva a cabo. Si la lesión de la fibra distal no ha sido severa, el crecimiento de la fibra en promedio es de 1 a 3 mm por día.

Es de anotar que la neurotmesis es la lesión más grave que se puede encontrar y necesita reparación quirúrgica, sin embargo de debe evaluar muy bien la lesión para elegir la técnica quirúrgica más adecuada.

Muchas estrategias han sido empleadas a través del tiempo para intentar corregir estos defectos, desde la primera técnica reportada entre 1870 y 1900. Con el desarrollo de la microcirugía y sus elementos, como la sutura primaria inmediata de extremo a extremo, o de extremo a la cara lateral de la fibra nerviosa, sutura epineural y sutura de fascículos individuales [28] se logró un mayor rango de tratamiento para este tipo de lesiones. Sin embargo, en algunos casos la lesión nerviosa deja un segmento muy amplio entre los extremos nerviosos que no permite una regeneración satisfactoria, por lo que ha sido necesario el empleo de injertos nerviosos, sean autoinjertos, aloinjertos o incluso xenoinjertos. Actualmente los mejores resultados son con la utilización de autoinjertos, los cuales por su parte presentan el inconveniente de ser limitados en su obtención [24], dependiendo de la longitud requerida para reparar el daño y de una posible lesión nerviosa en el sitio donante. Cabe destacar que por más de 100 años desde su incursión en el campo de la regeneración nerviosa [2], los autoinjertos continúan siendo el “gold standard” para la reparación de defectos de las fibras nerviosas periféricas [24] y es el mecanismo con el que se comparan las nuevas tecnologías en cuanto a aloinjertos se refiere. Los nervios más comúnmente utilizados en el proceso son el nervio sural y nervios cutáneos, pero también se han empleado ramas sensitivas del nervio radial, del nervio mediano e injertos del nervio cubital [29]. Actualmente las transferencias nerviosas o neurotizaciones están siendo ampliamente empleadas para este fin.

Como alternativa, se ha propuesto entonces la utilización de diferentes materiales [2, 6, 30] que pueden servir de conductos [31] para permitir una regeneración nerviosa adecuada, en pacientes en quienes el autoinjerto no es una opción, por el mecanismo de trauma, por la longitud de la lesión o por la falta de sitios para conseguir el injerto.

Cuando inicialmente se planteó esta posibilidad, se iniciaron estudios con poliésteres, pero se observó baja biocompatibilidad, dificultad en el procesamiento y degradación prematura, por lo que se hicieron modificaciones. También se intentó con otros materiales como silicona [32], poliuretano, ácido poliglicólico o mezclas de diferentes sustancias [24], siempre buscando que logren en lo posible los 3 principios básicos: biocompatibilidad, fuerza mecánica y una adecuada capacidad de conductancia [33].

Además de lograr el material que mejor contribuyera a la regeneración nerviosa, también se identificó la necesidad de acompañarlo de sustancias que incrementaran el crecimiento y la diferenciación de la fibra nerviosa [34] para lograr mejores resultados, por lo que se le ha dado gran importancia a componentes que hacen parte de la matriz extracelular y factores de crecimiento de diferentes líneas celulares [35-37]. También se ha observado que existe menor respuesta inflamatoria y menor fibrosis asociada con sellantes de fibrina [28] en comparación con las suturas usuales.

Células madre

El cuerpo humano contiene varios billones de células de cerca de 225 diferentes tipos celulares que componen los tejidos de los diferentes órganos. Estos diferentes tipos celulares se originan a partir de una única célula (el cigoto), a través de un complejo proceso de diferenciación durante el cual, grupos de genes particulares se activan o desactivan, dando a cada tipo celular, sus características de individualidad. La mayoría de las células diferenciadas no pueden replicarse y su reemplazo, cuando así se requiere, debe hacerse a partir de un grupo de células indiferenciadas que mantienen su capacidad de autorreplicarse: las células madre [38, 39].

Las células madre se pueden definir como un grupo de células indiferenciadas que poseen dos características principales: capacidad de autorrenovación y capacidad de diferenciación. La primera es asimétrica ya que una de las células conserva dicha capacidad y la otra se diferencia en un linaje especializado, incluso luego de un periodo de inactividad [40-43].

Además de las características anteriores, estas células tienen un enorme potencial de expansión; pueden diferenciarse a otros tipos celulares distintos a las células de los órganos en los que residen, capacidad conocida como plasticidad y pueden permanecer quiescentes en sus microambientes hasta que un estímulo adecuado las hace entrar nuevamente en sus ciclos celulares, situación que las protege de potenciales daños en su ADN y amplía el tiempo en que permanecen presentes en el tejido [39, 44-47].

Las células madre mesénquimales (MSCs)

Las MSC son una subpoblación de células indiferenciadas heterogéneas multipotentes, no hematopoyéticas, de origen mesodérmico, que conservan la capacidad de diferenciación a linajes mesénquimales [48-50].

Entre sus propiedades únicas, se ha demostrado que las MSCs pueden evadir el sistema inmune y ser indetectables durante largos periodos de tiempo, también se ha documentado sus propiedades inmunomoduladoras en enfermedades autoinmunes y han sido asociadas con una reducción de la incidencia de la enfermedad injerto vs huésped [51, 52].

Además de estas características, el Comité de Células Madre Mesénquimales y Tisulares de la Sociedad Internacional para Terapia Celular (ISCT) estableció 3 criterios mínimos para definir las MSC: 1) ser adherentes al plástico en condiciones estándar de cultivo en laboratorio, 2) deben ser positivas en la expresión de marcadores de linaje como Stro-1, CD90, CD73, CD13 y CD105 y negativas para CD11b, CD19, CD45, CD34, CD14, CD79α y HLA-DR, aunque persiste la dificultad de encontrar los marcadores moleculares que permitan su identificación apropiada *in situ*, y 3) capacidad de diferenciarse en osteoblastos, adipocitos y condroblastos *in vitro* [53-60].

Las células madre mesénquimales y regeneración nerviosa

La reparación quirúrgica de nervio periférico ha resultado insuficiente en el manejo clínico de lesiones nerviosas, sin poder solucionar problemas como la muerte neuronal, el lento crecimiento axonal y la pérdida de sensibilidad [61-63]. Las MSCs son una alternativa prometedora para terapias celulares en déficits neurológicos por su facilidad de obtención, rápido crecimiento y propiedades inmunomoduladoras que permiten trasplantes alogénicos [64-66].

Se han desarrollado diferentes técnicas con biomateriales para facilitar el crecimiento del nervio, siendo las más eficientes aquellas que incorporan células madre para mejorar la regeneración nerviosa basadas en la plasticidad celular [12, 67, 68]. Aunque aún se desconoce el mecanismo neurogénico de las MSCs, se han propuesto varios modelos: transdiferenciación a células nerviosas, fusión celular espontánea y secreción de factores de crecimiento y neurotácticos [19].

Varios estudios demuestran el potencial terapéutico de las MSCs en la terapia celular para la reparación nerviosa, existiendo ya ensayos clínicos en humanos para el tratamiento de la enfermedad de Parkinson [69].

Efecto Paracrino de las MSCs

Nuevas teorías sobre los mecanismos de acción de las MSCs proponen la secreción de moléculas biológicamente activas que inducen cambios fisiológicos en otras células, ofreciendo una vía de acción en donde las MSCs no necesitan diferenciarse a la población tisular específica para poder ser terapéuticas [52]. El reconocimiento de la importancia del efecto paracrino es demostrado por las nuevas estrategias de ingeniería genética que buscan incrementar la producción de factores biológicos [70-72].

Existe suficiente evidencia que demuestra la importancia de la actividad secretora de las células madre *in vivo* en la regulación de factores de crecimiento, citoquinas y en la reparación tisular [73, 74]. Cada día aumenta el número de moléculas que tienen efectos paracrinos y básicamente se pueden dividir según su función en: tróficos, inmunomoduladores, quimioatrayentes, antifibroticos y antiapoptoticos [52].

Medios condicionados (MC)

Los MC son los medios en el que se han cultivado células por un determinado tiempo, los cuales contienen factores de crecimiento y citoquinas secretados por las células cultivadas y liberadas al medio, responsables de la actividad biológica [40].

Usos y formas de empleo de los MC

Los MC de MSCs tienen un efecto similar a las células madre en su capacidad de disminuir el daño celular, con actividad neurotrópica y neuroprotectora en las neuronas locales, así como mecanismos de direccionamiento por moléculas de la matriz extracelular [75-77]. Existen teorías que explican la regeneración neuronal gracias a la acción de citoquinas y factores solubles liberados por las MSCs en el medio, con evidencia científica de la modificación del microambiente secundaria a la función exocrina y paracrina de estas [78, 79].

Modelos de lesión de nervio periférico en animales

Los estudios en animales han sido necesarios para lograr un mejor entendimiento de la lesión nerviosa y su regeneración, y para investigar nuevas formas para su reparación. El modelo de lesión en nervio ciático en ratas ha sido ampliamente escogido por que anatómicamente es un nervio largo que permite un estudio patológico completo y en cuanto a seguimiento se pueden estudiar patrones definidos en distintos grupos musculares para valorar su función [25].

El seguimiento funcional de las ratas ha generado diferentes enfoques para su objetivación, dado la enorme variabilidad en los resultados obtenidos[80], uno de los métodos empleados se ha hecho mediante observaciones y mediciones de la plantiflexión de la pata y el ángulo del tobillo durante la marcha[81], además la escala BBB, utilizada en ocasiones para seguimiento de lesión neurológica central, puede dar un valor adicional. En cuanto a la observación de la fase de apoyo durante la marcha es necesario tener en cuenta los 4 periodos de ésta: el contacto inicial, que se hace con los dedos; despegue opuesto, en el que los dedos terminan de apoyarse en el suelo, al igual que la planta del pie; elevación de talón en el que la tibia avanza hacia delante del eje del tobillo; y despegue en el que los dedos dejan el suelo posterior a realizar plantiflexión[82]. Posterior a una lesión neurológica los patrones se alteran y su observación juiciosa puede ayudar a determinar el estado de la lesión y de posible reinervación.

METODOLOGÍA

TIPO DE ESTUDIO

Estudio de tipo experimental *in vivo*.

TIPO DE MUESTRA

Para el estudio se usó el modelo animal de lesión de nervio periférico en ratas tipo Wistar, adquiridas en el bioterio de la Universidad Nacional de Colombia y el bioterio de la Pontificia Universidad Javeriana. Se mantuvieron bajo condiciones estándar, 12 horas de luz y oscuridad, agua y comida *ad libitum*.

TAMAÑO DE LA MUESTRA

Se conformaron siete (7) grupos de experimentación para realizar el procedimiento en la extremidad izquierda, tomando la derecha como control, distribuidos de la siguiente manera:

GRUPO	NERVIO CIÁTICO IZQUIERDO	
1	Cirugía falsa (sin neurectomía)	2
2	MSC	4
3	Autoinjerto	4
4	Matriz de fibrina	4
5	Medios condicionados	4
6	Autoinjerto + medios condicionados	4
7	Segunda intención	2

El periodo de observación total fue de 3 meses.

TUBOS DE SILICONA MÉDICA:

Se utilizaron tubos estériles de silicona médica biológicamente inerte de 14mm de longitud como conectores de los extremos nerviosos, dentro de los cuales se aplicará la matriz de fibrina.

MATRIZ DE FIBRINA

La matriz tridimensional de fibrina se elaboró de acuerdo con protocolos estandarizados, bajo condiciones de esterilidad. Se emplearon los siguientes componentes: Plasma sanguíneo humano (33.2%), solución salina estéril (53.32%), ácido tranexámico (0.64%), DMEM 10% de SFB (6.64%) y CaCl₂ estéril (6.64%). Una vez mezclados bajo condiciones completamente estériles, se deja gelificar a 37.5°C por 8 min.

CÉLULAS MADRE MESENQUIMALES HUMANAS

Las MSCs humanas fueron tomadas de un stock celular, previamente caracterizadas por citometría y diferenciación *in vitro*, que se han obtenido de tejido adiposo humano usando la técnica de explante bajo condiciones estériles.

MEDIOS CONDICIONADOS

Las MSCs derivadas de tejido adiposo se mantienen hasta el pasaje 8 con medio de cultivo DMEM bajo en glucosa suplementado al 10% con suero fetal bovino, penicilina 100U/ml, estreptomycin 100µg/ml e incubadas a 37°C en atmósfera húmeda con 5% de

CO₂. Cuando las células alcanzan el 80% de confluencia se retira el medio DMEM bajo en glucosa, se lavan tres veces con PBS y se adicionan 3ml de medio de cultivo libre de suero fetal bovino. Las células se incuban en este medio por 24 horas en una incubadora O₂/CO₂ programada para mantener una tensión de oxígeno del 2%, con las condiciones habituales de temperatura y humedad para cultivos celulares. Terminadas las 24 horas se retira el medio condicionado, se pasan por un filtro de 0.22µm y se almacena a -20°C

MATRIZ DE FIBRINA CON CÉLULAS MADRE MESENQUIMALES

Se sigue el mismo procedimiento para la elaboración de la matriz de fibrina descrito previamente, remplazando la solución salina y el medio de cultivo DMEM por células madre mesénquimales en suspensión a una concentración de 100.000 células/ml.

MATRIZ DE FIBRINA CON MEDIOS CONDICIONADOS DE MSCs

Se sigue el mismo procedimiento para la elaboración de la matriz de fibrina descrito previamente, remplazando la solución salina y el medio de cultivo DMEM por los medios condicionados de células madre mesénquimales en una concentración de 100µg /ml.

PROCEDIMIENTO QUIRURGICO

Luego de 2 semanas de adaptación en el bioterio, las ratas se llevan al sitio de operaciones donde el primer grupo son anestesiadas con una mezcla de Ketamina (80mg/kg) + Xilazina (5mg/kg) y el segundo grupo con isofluorane. Luego de 5 minutos de aplicada la anestesia, con el roedor en decúbito prono, previa asepsia y antisepsia, se realiza una incisión transversa en el muslo del animal, siguiendo el eje del fémur pero posterior a este, hasta la rodilla y se disecciona por planos en el rafe entre el músculo bíceps femoral y el glúteo, hasta lograr la exposición del nervio ciático, observando una longitud promedio de 24mm. Una vez identificado el nervio, se procederá según el grupo de experimentación así:

Grupo 1: En el muslo izquierdo se expone el nervio y se procede a cerrar fascia y piel.

Grupo 2: En el muslo izquierdo se resecan 10 mm del nervio y se fijan los extremos al tubo de silicona que contiene células madre. Cierre de fascia y piel.

Grupo 3: En el muslo izquierdo se reseca 10 mm del nervio y se procede a suturar nuevamente el segmento resecaado a los muñones correspondientes, como un injerto de nervio, cierre de fascia y piel.

Grupo 4: En el muslo izquierdo se resecan 10 mm del nervio y se fijan los extremos al tubo de silicona + matriz de fibrina. Sutura de fascia y piel.

Grupo 5: Igual procedimiento que en el grupo previo, pero se utiliza matriz con medios condicionados en los tubos de silicona. Sutura de fascia y piel.

Grupo 6: Igual procedimiento que en el grupo 3 pero posterior a la neurorrafia se aplican medios condicionados realizando un bolsillo al suturar parcialmente los músculos previamente mencionados. Cierre de piel.

Grupo 7: En el muslo izquierdo se reseca 10 mm del nervio, liberando únicamente el segmento de nervio, sin resecar, y se procede a suturar fascia y piel.

Luego se procede a cubrir la herida y administrar la dosis correspondiente de antibiótico profiláctico y analgesia. Finalmente se trasladarán los animales a sus jaulas y se monitorearán cada 10 min hasta su recuperación completa de la anestesia.

REGISTRO DE ELECTROMIOGRAFÍA

Se realiza electromiografía de gastrocnemios con el grupo de seguimiento a los 3 meses para verificar conducción.

1. Se llevaron los animales al sitio de procedimientos, y se aplicó anestesia inhalada con isoflurane hasta lograr un estado de reposo poco profundo.
2. Se utilizó un equipo de electromiografía Cadwell Sierra Wave y un electrodo de aguja concéntrica de calibre 27. Se exploró en cada rata el musculo gastrocnemio tanto de la extremidad intervenida como de la sana, para analizar el comportamiento del musculo en reposo en busca de signos de denervación, comparar los potenciales de unidad motora de las dos extremidades, así como evidencia de signos de reinervación.

OBTENCION DE MUESTRAS

Las ratas fueron sacrificadas con Eutanex y con cámara de CO₂. Se tomaron muestras de tejido muscular y nervioso, que fueron fijadas en paraformaldehído al 4%, luego lavadas con PBS conteniendo 30% de sucrosa y 0,1% de azida de sodio. Las muestras se mantendrán para estudios histopatológicos posteriores.

CRITERIOS DE EVALUACIÓN Y SEGUIMIENTO

La evaluación de la efectividad del tratamiento estará dada por:

1. La recuperación funcional, por medio de la escala de Basso, Bettie y Bresnahan (B.B.B.).
2. La recuperación funcional mediante seguimiento en video de la marcha y observación de las fases de ésta
3. La recuperación electrofisiológica con electromiografía a las 12 semanas.

ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Se analizó odds ratio entre los diferentes grupos de intervención y se determinó intervalo de confianza del 95% utilizando el software IBM SPSS23.

RESULTADOS

Inicialmente se tomó un grupo de 24 ratas divididas en los subgrupos según el protocolo, y los procedimientos se completaron en 6 días; sin embargo durante el seguimiento fue necesario un sacrificio temprano por complicaciones asociadas con un brote infeccioso pulmonar que afectó a todo el lote. Con ellas se llegó a un seguimiento de 6 semanas. Posteriormente fue necesario realizar un proceso con un nuevo grupo para lograr el seguimiento completo de 3 meses.

Todas las ratas fueron machos, de raza Wistar, el primer grupo con peso entre 200 gr y 400 gr y el segundo grupo con peso entre 350 gr y 560 gr.

Del primer grupo durante los primeros 3 días se tuvo una pérdida de 3 individuos por lo que se intervinieron 2 individuos adicionales. Entre las semanas 5 y 6, se tuvo una pérdida de 4 especímenes más. Se logró un seguimiento completo de 20 ratas en 6 semanas. Se realizaron los sacrificios programados durante el siguiente mes.

El peso durante el primer mes, se incrementó en 11 individuos, logrando en promedio en el grupo un aumento de 8 gr, mientras que en 7 individuos disminuyó, y en 5 siguió igual.

En el segundo grupo se tuvo una pérdida de 1 rata en los 2 primeros meses y 1 más durante el último mes. En las primeras 6 semanas el 71 % de los individuos tuvo una disminución de peso entre 3 y 55 gr.

En todas las ratas que fueron sometidas a sección del nervio se observó procesos de autofagia en la extremidad afectada, principalmente en los últimos 3 dedos, que cesaron después del primer mes, y se observó aparición de úlceras en el talón o en el pie.

Marcha

Se observó en video la marcha de los individuos en una plataforma de 80 cm, en el plano sagital. Durante el seguimiento, el principal segmento afectado de la extremidad fue el pie y los dedos, lo que durante la marcha se ve reflejado en la incapacidad para realizar el primer apoyo de pie y para completar la fase de despegue (fases 1 y 4 de la marcha). Todos los especímenes realizan la marcha principalmente con apoyo e impulso en planta y talón. En el primer grupo, en el primer mes de postoperatorio 3 individuos (sham y autoinjerto) presentaron algún grado de apoyo de los dedos en la primera fase y 12 individuos presentaban cierto contacto del antepie durante la fase de despegue, entre éstos se encuentran los 2 del subgrupo de cirugía falsa, 1 individuo de células madre, 3 de autoinjerto, 2 de matriz de fibrina, 2 de medios condicionados, 1 de segunda intención y 1 de autoinjerto y medios condicionados. Al finalizar el seguimiento, 3 individuos (1 medios condicionados, 1 autoinjerto y 1 medios condicionados + autoinjerto) lograron contacto de los dedos durante el apoyo inicial y 11 especímenes lograban una mejor fase de despegue, de los cuáles 4 individuos no lo hacían inicialmente, este mejor patrón de marcha se observó en dos especímenes del subgrupo de células madre, uno del subgrupo de matriz de fibrina y uno de autoinjerto con medios condicionados. Del segundo grupo 3 individuos presentaron contacto de dedos en el apoyo inicial (sham y autoinjerto + medios condicionados), 10 individuos presentaron contacto del antepie durante la fase de despegue al finalizar el seguimiento, de éstos 2 eran de células madre, 2 de medios condicionados, 2 de autoinjerto y medios condicionados y los 2 de cirugía falsa.

En el primer grupo, exceptuando los individuos con cirugía falsa, los especímenes que tuvieron mejoría en las 2 fases alteradas de la marcha fueron 2 del grupo de autoinjerto, 1 de medios condicionales y 1 de autoinjerto y medios condicionados. En el segundo grupo el único espécimen que tuvo mejoría en la 1 y 4 fase de la marcha fue uno perteneciente al subgrupo de autoinjerto y medios condicionados.

Electromiografía y neuroconducciones

No fue posible realizar el procedimiento en los especímenes 11 y 22 por muerte durante el periodo de observación.

En el grupo de Sham, no hubo signos de denervación y el examen electromiográfico fue normal.

En el grupo de autoinjerto el 75 % de los casos tenían signos de denervación leve o parcial con reinervación en un solo caso (reclutamiento del 100%); mientras que el 25 % restante no mostró signos de denervación ni reinervación.

En el grupo de segunda intención se observó un examen normal en 50% y denervación y reinervación parcial en el 50%

En el grupo de células madre el 25 % de los casos presentó denervación y reinervación parciales, el 50% denervación grave sin signos de reinervación y el 25 % restante no mostró signos de denervación ni reinervación.

En el grupo de medios condicionados el 25% presentó un examen normal, el 50% denervación grave sin presencia de reinervación. El caso restante no fue valorable por espécimen muerto.

En el grupo de matriz de fibrina todos los casos presentaron signos de denervación, el 75% parcial y el 25 % grave, sin reinervación en el 50% (incluyendo el caso de denervación grave) y con reinervación parcial en el 50%.

En el grupo de autoinjerto con medios condicionados un caso no fue posible examinar por muerte del espécimen, un caso presentó un examen normal y del 50 % restante hubo denervación y reinervación parcial en un caso y denervación grave sin reinervación en un caso.

Los grupos de medios condicionados mostraron un 25 % de especímenes con exámenes normales al igual que en el grupo de segunda intención. El grupo de células madre mostro los menores índices de reinervación observados; mientras que el grupo de matriz de fibrina mostro los mayores índices de denervación. El único caso que mostró reinervación con reclutamiento de 100% fue un espécimen del grupo de autoinjerto.

COMPLICACIONES

1. Adicionalmente al episodio de infección observado en el primer grupo, a los 4 días del procedimiento, se identificó dehiscencia de la sutura en el grupo de segunda intención, los individuos se llevaron a nuevo procedimiento quirúrgico en el que se realizó desbridamiento de los bordes de la herida y lavado quirúrgico bajo anestesia, posterior sutura de heridas.
2. Durante el seguimiento del patrón de marcha se identificó autofagia de los artejos en el pie lesionado, de aparición aleatoria entre los individuos de los diferentes subgrupos a excepción del grupo de cirugía falsa, se intentaron varios métodos para disminuir las lesiones y se revisó este tipo de complicación en la literatura, encontrando que puede ser secundario a parestesias por la lesión.

CONCLUSIONES

1. El patrón de marcha se vió alterado indistintamente en 6 de los 7 grupos; en el único que no se vio diferencia fue en el grupo de cirugía falsa. El análisis de la marcha evidenció imposibilidad para la movilidad principalmente del pie y los dedos, afectando la 1 y 4 fases de la marcha
2. En la escala B.B.B, dado ausencia de plantiflexión por la lesión se asimilaría a una clasificación 15/20 en 6 de los 7 los grupos, para el grupo 1 de cirugía falsa continúa siendo 20/20, recordando que la escala inicialmente fue creada para valorar trauma espinal. Durante el seguimiento la fase de despegue mejoró discretamente pero nunca llegó a ser consistente como para modificar el puntaje de la escala.
3. Los principales hallazgos de una patrón de marcha menos alterado se encontraron en los grupos de autoinjerto, medios condicionados y autoinjerto + medios condicionados.
4. Los cambios más importantes en el seguimiento electromiográfico fueron observados predominantemente en los grupos de autoinjerto, medios

condicionados y autoinjerto + medios condicionados. Dado que durante la regeneración nerviosa es posible pasar de un estado de denervación grave a uno parcial o a signos ausentes de denervación, es necesario realizar otros estudios para determinar la posibilidad de tomar estos datos como parte del proceso de reinervación.

5. No se encontró una diferencia estadísticamente significativa en ninguno de los grupos estudiados, al comparar los procedimientos con mejores patrones de marcha o signos de reinervación en el estudio electromiográfico.

CONSIDERACIONES ÉTICAS

La manipulación de los animales se llevó a cabo siguiendo los lineamientos internacionales [Instituto nacional de Salud de los Estados Unidos de América (National Association for Biomedical Research, 2007), ARVO] y nacionales [Artículo 11 de la resolución n°008430 de 1993 del Ministerio de Salud y Ley 84 del 27 de diciembre de 1989] con el fin de minimizar el sufrimiento animal.

El estudio fue avalado por el Comité de ética de la Universidad Nacional de Colombia.

Razón por la que se emplean animales experimentales

- El grupo de investigación “Biología de Células Madre” ha estandarizado la obtención de medios condicionados a partir de MSCs humanas.
- Los medios condicionados de MSCs han demostrado tener la misma capacidad regenerativa e inmunomoduladora de las MSCs en varios tejidos, pero no existe evidencia de su eficacia en modelos de lesión de nervio periférico.
- No existe un modelo *in vitro* de lesión de nervio periférico.
- Como parte de nuestro proceso investigativo se hace necesario evaluar ese potencial neurogénico en un modelo *in vivo* para analizar la capacidad de los medios condicionados en la regeneración nerviosa.

PROPIEDAD INTELECTUAL

La investigación y los aportes que esta pueda generar son avalados y de propiedad intelectual del grupo de Investigación de la Unidad de Ortopedia y Traumatología de la Universidad Nacional de Colombia y del grupo de investigación Biología de Células Madre de la Universidad Nacional de Colombia.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Ryu J, Beimesch CF, Lalli TJ: **(iii) Peripheral nerve repair**. *Orthopaedics and Trauma* 2011, **25**(3):174-180.
2. Deumens R, Bozkurt A, Meek MF, Marcus MA, Joosten EA, Weis J, Brook GA: **Repairing injured peripheral nerves: Bridging the gap**. *Progress in neurobiology* 2010, **92**(3):245-276.
3. Deal DN, Griffin JW, Hogan MV: **Nerve conduits for nerve repair or reconstruction**. *The Journal of the American Academy of Orthopaedic Surgeons* 2012, **20**(2):63-68.
4. Bhandari PS, Sadhotra LP, Bhargava P, Bath AS, Mukherjee MK, Bavdekar RD: **What is new in peripheral nerve repair?** *The Indian Journal of Neurotrauma* 2007, **4**(1):21-23.
5. Bushnell BD, McWilliams AD, Whitener GB, Messer TM: **Early clinical experience with collagen nerve tubes in digital nerve repair**. *The Journal of hand surgery* 2008, **33**(7):1081-1087.
6. Jiang X, Lim SH, Mao HQ, Chew SY: **Current applications and future perspectives of artificial nerve conduits**. *Experimental neurology* 2010, **223**(1):86-101.
7. Terris DJ, Cheng ET, Utley DS, Tarn DM, Ho PR, Verity AN: **Functional recovery following nerve injury and repair by silicon tubulization: comparison of laminin-fibronectin, dialyzed plasma, collagen gel, and phosphate buffered solution**. *Auris, nasus, larynx* 1999, **26**(2):117-122.
8. Zhang Y, Luo H, Zhang Z, Lu Y, Huang X, Yang L, Xu J, Yang W, Fan X, Du B *et al*: **A nerve graft constructed with xenogeneic acellular nerve matrix and autologous adipose-derived mesenchymal stem cells**. *Biomaterials* 2010, **31**(20):5312-5324.
9. Hejcl A, Lesny P, Pradny M, Michalek J, Jendelova P, Stulik J, Sykova E: **Biocompatible hydrogels in spinal cord injury repair**. *Physiological research / Academia Scientiarum Bohemoslovaca* 2008, **57 Suppl 3**:S121-132.
10. Hsu SH, Kuo WC, Chen YT, Yen CT, Chen YF, Chen KS, Huang WC, Cheng H: **New nerve regeneration strategy combining laminin-coated chitosan conduits and stem cell therapy**. *Acta Biomater* 2013, **9**(5):6606-6615.
11. Wu SM, Hochedlinger K: **Harnessing the potential of induced pluripotent stem cells for regenerative medicine**. *Nat Cell Biol* 2011, **13**(5):497-505.
12. di Summa PG, Kingham PJ, Raffoul W, Wiberg M, Terenghi G, Kalbermatten DF: **Adipose-derived stem cells enhance peripheral nerve regeneration**. *Journal of plastic, reconstructive & aesthetic surgery : JPRAS* 2010, **63**(9):1544-1552.
13. Ding T, Lu WW, Zheng Y, Li Z, Pan H, Luo Z: **Rapid repair of rat sciatic nerve injury using a nanosilver-embedded collagen scaffold coated with laminin and fibronectin**. *Regenerative medicine* 2011, **6**(4):437-447.
14. Shi Y, Su J, Roberts AI, Shou P, Rabson AB, Ren G: **How mesenchymal stem cells interact with tissue immune responses**. *Trends Immunol* 2012, **33**(3):136-143.
15. Ben-Ami E, Berrih-Aknin S, Miller A: **Mesenchymal stem cells as an immunomodulatory therapeutic strategy for autoimmune diseases**. *Autoimmun Rev* 2011, **10**(7):410-415.
16. Glotzbach JP, Wong VW, Gurtner GC, Longaker MT: **Regenerative medicine**. *Curr Probl Surg* 2011, **48**(3):148-212.

17. Uccelli A: **Mesenchymal stem cells exert a remarkable regenerative effect requiring minimal CNS integration: Commentary on: "Mesenchymal stem cells protect CNS neurons against glutamate excitotoxicity by inhibiting glutamate receptor expression and function"** by Voulgari-Kokota et al. *Experimental neurology* 2013.
18. Ruff CA, Wilcox JT, Fehlings MG: **Cell-based transplantation strategies to promote plasticity following spinal cord injury.** *Experimental neurology* 2012, **235**(1):78-90.
19. Maltman DJ, Hardy SA, Przyborski SA: **Role of mesenchymal stem cells in neurogenesis and nervous system repair.** *Neurochemistry international* 2011, **59**(3):347-356.
20. Falavigna A, Costa da Costa J: **Mesenchymal Autologous Stem Cells.** *World neurosurgery* 2013.
21. Timmers L, Lim SK, Hofer IE, Arslan F, Lai RC, van Oorschot AA, Goumans MJ, Strijder C, Sze SK, Choo A *et al*: **Human mesenchymal stem cell-conditioned medium improves cardiac function following myocardial infarction.** *Stem Cell Res* 2011, **6**(3):206-214.
22. Xu YX, Chen L, Wang R, Hou WK, Lin P, Sun L, Sun Y, Dong QY: **Mesenchymal stem cell therapy for diabetes through paracrine mechanisms.** *Medical hypotheses* 2008, **71**(3):390-393.
23. Pabari A, Yang SY, Mosahebi A, Seifalian AM: **Recent advances in artificial nerve conduit design: strategies for the delivery of luminal fillers.** *Journal of controlled release : official journal of the Controlled Release Society* 2011, **156**(1):2-10.
24. Shi W, Yao J, Chen X, Lin W, Gu X, Wang X: **The delayed repair of sciatic nerve defects with tissue-engineered nerve grafts in rats.** *Artificial cells, blood substitutes, and immobilization biotechnology* 2010, **38**(1):29-37.
25. Wood MD, Kemp SW, Weber C, Borschel GH, Gordon T: **Outcome measures of peripheral nerve regeneration.** *Annals of anatomy = Anatomischer Anzeiger : official organ of the Anatomische Gesellschaft* 2011, **193**(4):321-333.
26. Johnson EO, Zoubos AB, Soucacos PN: **Regeneration and repair of peripheral nerves.** *Injury* 2005, **36 Suppl 4**:S24-29.
27. Dahlin LB, Brandt J: **Basic science of peripheral nerve repair: Wallerian degeneration/growth cones.** *Operative Techniques in Orthopaedics* 2004, **14**(3):138-145.
28. Jeans LA, Gilchrist T, Healy D: **Peripheral nerve repair by means of a flexible biodegradable glass fibre wrap: a comparison with microsurgical epineurial repair.** *Journal of plastic, reconstructive & aesthetic surgery : JPRAS* 2007, **60**(12):1302-1308.
29. Allan CH, Trumble TE: **Biomechanics of peripheral nerve repair.** *Operative Techniques in Orthopaedics* 2004, **14**(3):184-189.
30. Jeans LA, Gilchrist T, Healy D: **Peripheral nerve repair by means of a flexible biodegradable glass fibre wrap: A comparison with microsurgical epineurial repair.** *Journal of Plastic, Reconstructive & Aesthetic Surgery* 2007, **60**(12):1302-1308.
31. Fu KY, Dai LG, Chiu IM, Chen JR, Hsu SH: **Sciatic nerve regeneration by microporous nerve conduits seeded with glial cell line-derived neurotrophic factor or brain-derived neurotrophic factor gene transfected neural stem cells.** *Artificial organs* 2011, **35**(4):363-372.
32. Puente-Alonso C, Pi-Folguera J, Sánchez-Flo R, Berenguer-Sánchez A, Ros-Munne V: **Repair of nerve injuries in the forearm using a silicone tube. Long-**

- term clinical results.** *Revista Española de Cirugía Ortopédica y Traumatología (English Edition)* 2011, **55**(2):79-84.
33. Nectow AR, Marra KG, Kaplan DL: **Biomaterials for the development of peripheral nerve guidance conduits.** *Tissue engineering Part B, Reviews* 2012, **18**(1):40-50.
 34. Yu W, Zhao W, Zhu C, Zhang X, Ye D, Zhang W, Zhou Y, Jiang X, Zhang Z: **Sciatic nerve regeneration in rats by a promising electrospun collagen/poly(epsilon-caprolactone) nerve conduit with tailored degradation rate.** *BMC neuroscience* 2011, **12**:68.
 35. Takagi T, Kimura Y, Shibata S, Saito H, Ishii K, Okano HJ, Toyama Y, Okano H, Tabata Y, Nakamura M: **Sustained bFGF-release tubes for peripheral nerve regeneration: comparison with autograft.** *Plastic and reconstructive surgery* 2012, **130**(4):866-876.
 36. Yu W, Wang J, Yin J: **Platelet-rich plasma: a promising product for treatment of peripheral nerve regeneration after nerve injury.** *The International journal of neuroscience* 2011, **121**(4):176-180.
 37. Zavan B, Abatangelo G, Mazzoleni F, Bassetto F, Cortivo R, Vindigni V: **New 3D hyaluronan-based scaffold for in vitro reconstruction of the rat sciatic nerve.** *Neurological research* 2008, **30**(2):190-196.
 38. Stocum DL: **Stem cells in regenerative biology and medicine.** *Wound Repair Regen* 2001, **9**(6):429-442.
 39. Sadiq TS, Gerber DA: **Stem cells in modern medicine: reality or myth?** *J Surg Res* 2004, **122**(2):280-291.
 40. Sanchez R, Chaparro O: **Comparación del efecto de medios condicionados de cultivos de 2 tipos de células madre mesenquimales sobre la cicatrización de heridas en ratones.** Bogotá: Universidad Nacional de Colombia; 2011.
 41. Aejaz HM, Aleem AK, Parveen N, Khaja MN, Narusu ML, Habibullah CM: **Stem cell therapy-present status.** *Transplant Proc* 2007, **39**(3):694-699.
 42. Beltrán O, Quintero LO, Chaparro O: **Plasticidad y transdiferenciación en células STEM adultas- revisión.** Colombia: Red Revista Med; 2005.
 43. Cha J, Falanga V: **Stem cells in cutaneous wound healing.** *Clinics in dermatology* 2007, **25**(1):73-78.
 44. Yen CC, Yang SH, Lin CY, Chen CM: **Stem cells in the lung parenchyma and prospects for lung injury therapy.** *European journal of clinical investigation* 2006, **36**(5):310-319.
 45. Vats A, Tolley NS, Polak JM, Buttery LDK: **Stem cells: sources and applications.** *Clinical Otolaryngology & Allied Sciences* 2002, **27**(4):227-232.
 46. Hatina J, Schulz WA: **Cancer Stem Cells – Basic Concepts.** In: eLS. John Wiley & Sons, Ltd; 2001.
 47. Bongso A, Richards M: **History and perspective of stem cell research.** *Best Practice & Research Clinical Obstetrics & Gynaecology* 2004, **18**(6):827-842.
 48. Owen ME: **Marrow Stromal Cell Culture:** Cambridge University Press; 1998.
 49. Musina RA, Yegorov YY, Belyavsky AV: **Stem Cells: Properties and Prospective Medical Applications.** *Molecular Biology* 2004, **38**(4):469-481.
 50. Zandstra PW, Nagy A: **Stem cell bioengineering.** *Annu Rev Biomed Eng* 2001, **3**:275-305.
 51. Aggarwal S, Pittenger MF: **Human mesenchymal stem cells modulate allogeneic immune cell responses.** *Blood* 2005, **105**(4):1815-1822.
 52. Meirelles Lda S, Fontes AM, Covas DT, Caplan AI: **Mechanisms involved in the therapeutic properties of mesenchymal stem cells.** *Cytokine Growth Factor Rev* 2009, **20**(5-6):419-427.

53. Bianco P, Riminucci M, Gronthos S, Robey PG: **Bone marrow stromal stem cells: nature, biology, and potential applications.** *Stem Cells* 2001, **19**(3):180-192.
54. da Silva Meirelles L, Caplan AI, Nardi NB: **In search of the in vivo identity of mesenchymal stem cells.** *Stem Cells* 2008, **26**(9):2287-2299.
55. De Ugarte DA, Morizono K, Elbarbary A, Alfonso Z, Zuk PA, Zhu M, Dragoo JL, Ashjian P, Thomas B, Benhaim P *et al.*: **Comparison of multi-lineage cells from human adipose tissue and bone marrow.** *Cells, tissues, organs* 2003, **174**(3):101-109.
56. Dominici M, Le Blanc K, Mueller I, Slaper-Cortenbach I, Marini F, Krause D, Deans R, Keating A, Prockop D, Horwitz E: **Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement.** *Cytotherapy* 2006, **8**(4):315-317.
57. Hocking AM, Gibran NS: **Mesenchymal stem cells: paracrine signaling and differentiation during cutaneous wound repair.** *Exp Cell Res* 2010, **316**(14):2213-2219.
58. Meirelles Lda S, Nardi NB: **Methodology, biology and clinical applications of mesenchymal stem cells.** *Frontiers in bioscience : a journal and virtual library* 2009, **14**:4281-4298.
59. Sensebe L, Krampera M, Schrezenmeier H, Bourin P, Giordano R: **Mesenchymal stem cells for clinical application.** *Vox Sang* 2010, **98**(2):93-107.
60. Traktuev DO, Merfeld-Clauss S, Li J, Kolonin M, Arap W, Pasqualini R, Johnstone BH, March KL: **A population of multipotent CD34-positive adipose stromal cells share pericyte and mesenchymal surface markers, reside in a periendothelial location, and stabilize endothelial networks.** *Circ Res* 2008, **102**(1):77-85.
61. Fu SY, Gordon T: **The cellular and molecular basis of peripheral nerve regeneration.** *Molecular neurobiology* 1997, **14**(1-2):67-116.
62. Lundborg G: **A 25-year perspective of peripheral nerve surgery: evolving neuroscientific concepts and clinical significance.** *J Hand Surg Am* 2000, **25**(3):391-414.
63. McKay Hart A, Brannstrom T, Wiberg M, Terenghi G: **Primary sensory neurons and satellite cells after peripheral axotomy in the adult rat: timecourse of cell death and elimination.** *Experimental brain research Experimentelle Hirnforschung Experimentation cerebrale* 2002, **142**(3):308-318.
64. Schaffler A, Buchler C: **Concise review: adipose tissue-derived stromal cells--basic and clinical implications for novel cell-based therapies.** *Stem Cells* 2007, **25**(4):818-827.
65. Seo BM, Miura M, Gronthos S, Bartold PM, Batouli S, Brahim J, Young M, Robey PG, Wang CY, Shi S: **Investigation of multipotent postnatal stem cells from human periodontal ligament.** *Lancet* 2004, **364**(9429):149-155.
66. Vandenabeele F, De Bari C, Moreels M, Lambrichts I, Dell'Accio F, Lippens PL, Luyten FP: **Morphological and immunocytochemical characterization of cultured fibroblast-like cells derived from adult human synovial membrane.** *Archives of histology and cytology* 2003, **66**(2):145-153.
67. Ghoreishian M, Rezaei M, Beni BH, Javanmard SH, Attar BM, Zalzali H: **Facial nerve repair with Gore-Tex tube and adipose-derived stem cells: an animal study in dogs.** *J Oral Maxillofac Surg* 2013, **71**(3):577-587.
68. McGrath AM, Brohlin M, Kingham PJ, Novikov LN, Wiberg M, Novikova LN: **Fibrin conduit supplemented with human mesenchymal stem cells and**

- immunosuppressive treatment enhances regeneration after peripheral nerve injury.** *Neuroscience letters* 2012, **516**(2):171-176.
69. Venkataramana NK, Kumar SK, Balaraju S, Radhakrishnan RC, Bansal A, Dixit A, Rao DK, Das M, Jan M, Gupta PK *et al*: **Open-labeled study of unilateral autologous bone-marrow-derived mesenchymal stem cell transplantation in Parkinson's disease.** *Transl Res* 2010, **155**(2):62-70.
 70. Gneocchi M, He H, Liang OD, Melo LG, Morello F, Mu H, Noiseux N, Zhang L, Pratt RE, Ingwall JS *et al*: **Paracrine action accounts for marked protection of ischemic heart by Akt-modified mesenchymal stem cells.** *Nat Med* 2005, **11**(4):367-368.
 71. Tang YL, Tang Y, Zhang YC, Qian K, Shen L, Phillips MI: **Improved graft mesenchymal stem cell survival in ischemic heart with a hypoxia-regulated heme oxygenase-1 vector.** *J Am Coll Cardiol* 2005, **46**(7):1339-1350.
 72. Wang X, Zhao T, Huang W, Wang T, Qian J, Xu M, Kranias EG, Wang Y, Fan GC: **Hsp20-engineered mesenchymal stem cells are resistant to oxidative stress via enhanced activation of Akt and increased secretion of growth factors.** *Stem Cells* 2009, **27**(12):3021-3031.
 73. Guo Y, Graham-Evans B, Broxmeyer HE: **Murine embryonic stem cells secrete cytokines/growth modulators that enhance cell survival/anti-apoptosis and stimulate colony formation of murine hematopoietic progenitor cells.** *Stem Cells* 2006, **24**(4):850-856.
 74. Lu P, Jones LL, Snyder EY, Tuszynski MH: **Neural stem cells constitutively secrete neurotrophic factors and promote extensive host axonal growth after spinal cord injury.** *Experimental neurology* 2003, **181**(2):115-129.
 75. Chen CJ, Ou YC, Liao SL, Chen WY, Chen SY, Wu CW, Wang CC, Wang WY, Huang YS, Hsu SH: **Transplantation of bone marrow stromal cells for peripheral nerve repair.** *Experimental neurology* 2007, **204**(1):443-453.
 76. Chopp M, Li Y: **Treatment of neural injury with marrow stromal cells.** *Lancet neurology* 2002, **1**(2):92-100.
 77. Haynesworth SE, Baber MA, Caplan AI: **Cytokine expression by human marrow-derived mesenchymal progenitor cells in vitro: effects of dexamethasone and IL-1 alpha.** *Journal of cellular physiology* 1996, **166**(3):585-592.
 78. Chen J, Chopp M: **Neurorestorative treatment of stroke: cell and pharmacological approaches.** *NeuroRx : the journal of the American Society for Experimental NeuroTherapeutics* 2006, **3**(4):466-473.
 79. Chen X, Li Y, Wang L, Katakowski M, Zhang L, Chen J, Xu Y, Gautam SC, Chopp M: **Ischemic rat brain extracts induce human marrow stromal cell growth factor production.** *Neuropathology : official journal of the Japanese Society of Neuropathology* 2002, **22**(4):275-279.
 80. Geuna S: **The sciatic nerve injury model in pre-clinical research.** *Journal of neuroscience methods* 2015, **243**:39-46.
 81. Varejao AS, Cabrita AM, Meek MF, Bulas-Cruz J, Filipe VM, Gabriel RC, Ferreira AJ, Geuna S, Winter DA: **Ankle kinematics to evaluate functional recovery in crushed rat sciatic nerve.** *Muscle & nerve* 2003, **27**(6):706-714.
 82. Varejao AS, Cabrita AM, Meek MF, Bulas-Cruz J, Gabriel RC, Filipe VM, Melo-Pinto P, Winter DA: **Motion of the foot and ankle during the stance phase in rats.** *Muscle & nerve* 2002, **26**(5):630-635.

ANEXOS

Tabla 1. Resultados electromiográficos

Rata	Cirugía	Denervación	Polifásicas	Reclutamiento	Observaciones
1	S. Intención	No	No	100%	Sin denervación, examen normal
2	Autoinjerto	+/+	No	25%	Denervación parcial, sin evidencia de reinervación
3	S. Intención	+++	+/+	25%	Denervación parcial y reinervación parcial
4	Autoinjerto	+/+	+/+	100%	Denervación leve, adecuada reinervación
5	MSC	+/+	+/+	50%	Denervación parcial y reinervación parcial
6	MSC	+++	No	0%	Denervación grave, sin evidencia de reinervación
7	MSC	No	No	75%	Sin denervación ni evidencia de reinervación
8	MSC	+++	No	0%	Denervación grave, sin evidencia de reinervación
9	Medios	+++	No	0%	Denervación grave, sin evidencia de reinervación
10	Medios	++++	No	0%	Denervación grave, sin evidencia de reinervación
11	Medios	nd	nd	nd	No se examinó
12	Medios	No	No	100%	Sin denervación, examen normal
13	Matriz sola	+/+	+/+	75%	Denervación parcial y reinervación parcial
14	Matriz sola	++++	No	0%	Denervación grave, sin evidencia de reinervación
15	Matriz sola	+/+	+/+	25%	Denervación parcial y reinervación parcial
16	Matriz sola	+++	No	25%	Denervación parcial, sin evidencia de reinervación
17	Auto + MC	No	+++	75%	Sin denervación, reinervación parcial
18	Auto + MC	++++	No	0%	Denervación grave, sin evidencia de reinervación
19	Autoinjerto	No	No	50%	Sin denervación ni evidencia de reinervación
20	Autoinjerto	+/+	No	50%	Denervación parcial, sin evidencia de reinervación
21	Auto + MC	No	No	100%	Sin denervación, examen normal
22	Auto + MC	nd	nd	nd	No se examinó
23	Sham	No	No	100%	Sin denervación, examen normal
24	Sham	No	No	100%	Sin denervación, examen normal

Tabla 2. Seguimiento de la marcha primer grupo. 09/05/2014

MARCHA RATAS VIDEO 9/5/2014					
		FASE 1	FASE 2	FASE 3	FASE 4
1	Sham	x	X	X	X
2	Sham	x	x	x	x
3	MSC		x	x	x
4	MSC		x	x	
5	
6	MSC		x	x	
7	MF		x	x	
8	MF		x	x	
9	
10	MF		x	x	*
11	AI	*	x	x	*
12	AI		x	x	x
13	AI		x	x	x
14	AI		x	x	
15	MF		x	x	*
16	MC		x	x	x
17	MC		x	x	
18	MC		x	x	*
19	MC		x	x	
20	MSC		x	x	
21	2ª Inten.		x	x	x
22	2ª Inten.		x	x	
23	
24	AI + MC		x	x	x
25	AI + MC		x	x	
26	AI + MC		x	x	

. Muerte del espécimen.

Tabla 3. Seguimiento de la marcha primer grupo. 23/05/2014

MARCHA RATAS VIDEO 23/5/2014					
		FASE 1	FASE 2	FASE 3	FASE 4
1	Sham	x	x	x	x
2	Sham	x	x	x	x
3	MSC		x	x	x
4	MSC		x	x	
5	
6	MSC		x	x	*
7	MF
8	MF		x	x	*
9	
10	MF		x	x	*
11	AI		x	x	x
12	AI	*	x	x	x
13	AI		x	x	
14	AI		x	x	
15	MF		x	x	
16	MC		x	x	
17	MC		x	x	
18	MC	*	x	x	x
19	MC		x	x	
20	MSC		x	x	*
21	2ª Inten.
22	2ª Inten.
23	
24	AI + MC
25	AI + MC		x	x	
26	AI + MC	*	x	x	*

Tabla 4. Seguimiento de la marcha. Segundo grupo. 27/02/2016.

MARCHA RATAS VIDEO 27/02/2016					
	FASE 1	FASE 1	FASE 2	FASE 3	FASE 4
1 SEGUNDA INTENCIÓN			x	x	
2 AUTOINJERTO			x	x	
3 SEGUNDA INTENCIÓN			x	x	*
4 AUTOINJERTO			x	x	
5 CÉLULAS MADRE			x	x	x
6 CÉLULAS MADRE			x	x	
7 CÉLULAS MADRE CON MEDIOS			x	x	*
8 CÉLULAS MADRE CON MEDIOS			x	x	
9 TUBO + MEDIOS CONDICIONADOS			x	x	
10 TUBO + MEDIOS CONDICIONADOS			x	x	*
11 TUBO + MEDIOS CONDICIONADOS
12 TUBO + MEDIOS CONDICIONADOS			x	x	
13 TUBO CON MATRIZ			x	x	
14 TUBO CON MATRIZ			x	x	
15 TUBO CON MATRIZ				x	
16 TUBO CON MATRIZ			x	x	
17 AUTOINJERTO + MEDIOS CONDICIONADOS	*		x	x	x
18 AUTOINJERTO + MEDIOS CONDICIONADOS			x	x	x
19 AUTOINJERTO			x	x	
20 AUTOINJERTO			x	x	x
21 AUTOINJERTO			x	x	*
22 AUTOINJERTO
23 SHAM	x	x	x	x	x
24 SHAM	x	x	x	x	x

* NO REALIZA LA FASE COMPLETA

Tabla 5. Análisis estadístico. Reinervación. Segundo grupo.

	Odds ratio	Intervalo de confianza
MC/MSC	1.33	0.129 - 13.74
AI/MC	0.75	0.073 - 7.73
AI+MC/MC	2	0.334 - 11.96
MF/MC	1.5	0.23 - 9.79
MC/ Segunda intención	0.33	0.67 - 1.65

Tabla 6. Análisis estadístico. Realización Fase 1 de la marcha, Primer grupo.

09/05/2014	Odds ratio	Intervalo de confianza
MC/MSC	NS	NS
AI/MC	1.25	0.4 - 1.8
AI+MC/MC	NS	NS
MC/MF	NS	NS
Segunda intención/MC	NS	NS
23/05/2014	Odds ratio	Intervalo de confianza
MC/MSC	1.2	0.4 - 17
AI/MC	1	0.09 - 11
AI+MC/MC	4	0.7 - 21
MC/MF	NS	NS
Segunda intención/MC	NS	NS

Tabla 7. Análisis estadístico. Realización Fase 4 de la marcha. Primer grupo.

09/05/2014	Odds ratio	Intervalo de confianza
MC/MSC	2	0.2 - 14
AI/MC	1.5	0.4 - 4.6
AI+MC/MC	0.6	0.1 - 4.3
MC/MF	1.5	2.3 - 9.7
Segunda intención/MC	1	0.1 - 5.4
23/05/2014	Odds ratio	Intervalo de confianza
MC/MSC	0.3	0.05 - 1.9
AI/MC	2	0.2 - 14
AI+MC/MC	4	0.7 - 21
MC/MF	0.3	0.05 - 2.4
MC/ Segunda intención	NS	NS

Tabla 8. Análisis estadístico. Realización Fase 1 de la marcha, Segundo grupo.

	Odds ratio	Intervalo de confianza
MC/MS	NS	NS
AI/MC	NS	NS
AI+MC/MC	NS	NS
MF/MC	NS	NS
MC/ Segunda intención	NS	NS

Tabla 9. Análisis estadístico. Realización Fase 4 de la marcha. Segundo grupo.

	Odds ratio	Intervalo de confianza
MC/MS	0.5	0.07 - 3.5
AI/MC	1	0.9 - 11
AI+MC/MC	3	0.5 - 17
MC/MF	1.3	0.7 - 2.3
MC/ Segunda intención	0.5	0.05 - 4.4