

ISBN 970-27-1045-6

EVALUACION DE LA CINEMATICA DEL CAMINADO EN LA REPARACION TARDIA DEL NERVIO CIATICO DE LA RATA ADULTA CON PRÓTESIS DE QUITOSANA Y PROGESTERONA

Sarabia-Estrada Rachel †, *Rivas-Celis Efrain* †, *Jiménez-Vallejo Salvador* †, *Dueñas-Jimenez Sergio Horacio* ††, *Jimenez-Estrada Ismael* †††, *Gómez-Rodiles Carmen Cecilia* †, *Bañuelos-Pineda Jacinto* (jpineda@cucba.udg.mx) †.

† Departamento de Medicina Veterinaria, CUCBA, †† Laboratorio de Neurofisiología, CUCS., Universidad de Guadalajara, Guadalajara, Jal. ††† Departamento de Fisiología Biofísica y Neurofisiología, CINVESTAV-IPN, México, D.F.

Resumen

La tubulización de un nervio seccionado es una técnica adecuada para el proceso regenerativo cuando hay pérdida de un segmento de nervio. Se ha aplicado en modelos de reparación inmediata, pero no en los de reparación tardía. Los materiales utilizados han sido sintéticos, como el silicón y de origen natural (biodegradables y biocompatibles) como la quitosana. Ésta última, ha sido utilizada para crear dispositivos de crecimiento axonal en sistema nervioso periférico. Los tubos pueden ser impregnados con factores químico-biológicos los que también ayudarían al proceso de la regeneración nerviosa. Los estudios previos han evaluado la regeneración morfológica del nervio ciático de la rata, el perro y la del nervio facial de conejo. En este estudio evaluamos la regeneración funcional del nervio ciático mediante la valoración de la locomoción de la extremidad del nervio lesionado, la respuesta de los potenciales de acción del nervio ciático regenerado, así como la actividad de neuronas motoras por la respuesta electromiográfica de los músculos gastrocnemios. La evaluación se realizó tanto en la reparación inmediata o tardía del nervio ciático seccionado usando tubos con quitosana impregnados o no con progesterona.

Introducción

El nervio ciático de la rata es un nervio periférico que se origina en el plexo lumbosacro y se bifurca en el muslo dando origen al nervio tibial y común peroneal. Está localizado en la parte lateral del fémur por debajo del músculo femoral. Estos nervios inervan varios músculos del miembro posterior, involucrados en la flexión y extensión de la rodilla y tobillo así como el lado lateral del muslo y del quinto dedo (*Ijkema y col., 2004*). Es frecuentemente tomado como modelo para estudiar la degeneración y regeneración de fibras nerviosas periféricas, ya que es un nervio de considerable tamaño y contiene axones y fibras mixtas (mielinizadas y amielínicas).

La reparación de nervios periféricos lesionados no es un concepto reciente, existen reportes de reparaciones nerviosas que datan de 1836. Convencionalmente se realiza la sutura y aproximación de los segmentos dañados, técnica de reparación más común, pero que no lleva a una recuperación funcional completa. Como alternativa a esta técnica y con pronóstico funcional favorable se utiliza la *tubulización*. Este sistema consiste en unir defectos en la continuidad de un nervio seccionado y/o que han perdido un segmento, para dirigir el proceso regenerativo, manteniendo una comunicación química entre el muñón proximal y distal (*Dahlin y col., 2001*).

Para elaborar tubos se utilizan materiales naturales o sintéticos y que deben reunir ciertas cualidades como, una pared y un canal poroso, ser biodegradable, tener la capacidad de liberar factores bioactivos, de incorporar células y una matriz de orientación que soporte su migración sin colapsarse y además que sirva de sustrato de orientación para un nervio en regeneración sin intervenir con la propia regeneración. En la ingeniería de tejidos existe una necesidad de crear biomateriales (material sintético, natural o natural modificado, destinado a estar en contacto e interactuar con un sistema biológico) efectivos que puedan ser utilizados como injertos para una gran variedad de aplicaciones biomédicas. Un aspecto importante en la aplicación de los biomateriales es que deben ser biocompatibles (*Sastre y col., 2004*).

En el campo de los biomateriales de origen natural y degradables, aparece la quitosana. La quitosana es un carbohidrato polimerizado y derivado de la quitina, es un polisacárido de estructura lineal que se encuentra en el exoesqueleto de crustáceos, derivado de la quitina. La quitina es el segundo biopolímero más abundante encontrado en la naturaleza, y, tal vez, la menos conocida (el primero es la celulosa) es un producto de desecho de la industria alimentaria marina.

La quitina es un polisacárido formado por el azúcar N-acetilglucosamina y al perder un grupo acetilo se deriva en quitosana, configurándose como una D-glucosamina (*Benavides-Cuellar, 2002*). Ambas sustancias, pertenecen a la familia de los carbohidratos y por ser de origen natural, poseen la característica de ser biodegradables y biocompatibles (*Yang, 2003*). De la quitosana se conoce además, su potencial bacteriostático y antimicrobiano. Presenta propiedades físicas favorables, lo que nos permite utilizarla en diferentes formas, manteniendo su estructura y flexibilidad. Por sus características físicas, químicas y biológicas, la quitosana es un biomaterial de aplicación biomédica y que fácilmente puede ser procesada a suturas, protectores de heridas, injertos, membranas, cápsulas, láminas porosas, tubos, microsferas, etc (*Gómez-Pinedo y col., 2001, Haipeng y col., 2000, Kast y col., 2003, Rosales-Cortés y col., 2003, Wei y col., 2003, Yamaguchi y col., 2003*).

Material y metodos

Se utilizaron 54 ratas macho adultas de la cepa wistar, con un peso de 200-250 gramos, se mantuvieron alojados en condiciones controladas de bioterio, con ciclos de luz/oscuridad de 12:12 horas, con agua y alimento disponibles a libre acceso. Todos los animales recibieron una inyección intramuscular de ketamina (90 mg/kg) y xilazina (10 mg/kg). Se llevó a cabo una incisión vertical a nivel de la unión de los músculos glúteo superficial y bíceps femoral, mediante disección roma se separaron y se localizó el tercio

superior del nervio ciático. Los animales se dividieron en 2 grupos. Al grupo 1 (reparación inmediata) se le provocó una lesión por neurotmesis y se retiraron 5 mm del nervio, llevándose a cabo la reparación inmediata con tubos de quitosana (n=12) o quitosana con progesterona (n=12) o silicon (n=6). Al grupo 2 se le practico la misma lesión mediante un corte completo del eje nervioso pero sin retirar ningún segmento, después de 1 hora se cortaron 2.5 mm del extremo proximal y 2.5 mm del extremo distal, llevándose a cabo la reparación secundaria del nervio con tubos de quitosana (n=12) o quitosana con progesterona (n=12). Se llevaron a cabo pruebas electrofisiologicas a los 90,180 y 285 días despues del tratamiento, en ratas anestesiadas se realizo diseccion del musculo biceps femoral para localizar el nervio ciatico, se coloco un electrodo de manguito para estimulacion electrica o el registro de la respuesta del potencial de accion del nervio ciatico, tambien se utilizaron electrodos de aguja para registrar la respuesta electromiografica en los musculos gastrocnemios. Se evaluo tambien en cada rata, la duracion longitud, y velocidad del paso, asi como las variaciones angulares en rodilla y tobillo (tomado de 3-5 pasos consecutivos). El analisis se llevo a cabo antes de la seccion nerviosa y a los 90, 180 y 285 dias.

Conclusiones

1. En los animales tubulizados con quitosana impregnando o no el tubo con progesterona se presenta una reinervación variada.
2. Existen ramas del nervio BF que inervan al músculo G.
3. La inervación de músculo G se da también por ramas que proceden del nervio ciático regenerado pero que terminan en cualquier parte del músculo.
4. Las ramas que salen del tubo pueden ser activadas eléctricamente y producir contracción el el músculo G. Sin embargo la estimulación del tronco proximal del nervio ciático es incapaz de activarlas.
5. No se pudo registrar potencial de nervio en los animales con reparación del ciático probablemente porque solo un pequeño número de fibras son regeneradas, o bien porque se dañan estas fibras al colocar el electrodo de manguito.
6. La respuesta del EMG registrada con electrodos de aguja en músculo G debe ser cuidadosamente evaluado para descartar respuesta de los registros EMG de músculos adyacentes como el BF.
7. La cinemática de la locomoción de las ratas lesionadas y con supuesta regeneración se encuentra alterada con cambios significativos en la velocidad de locomoción y el desplazamiento angular de la articulación de la rodilla y el tobillo.
8. No es posible establecer con estos experimentos iniciales un patrón de reinervación funcional promovida por la tubulización con implantes de quitosana impregnados de progesterona.

Bibliografía

- Benavides-Cuellar, MA. (2002) Quitina-Quitosa. Los polímeros del futuro. División de comunicaciones, Servicio Nacional de Aprendizaje SENA, Centro de Desarrollo Tecnológico y Asistencia Técnica a la Industria. Santiago de Cali.
- Dahlin LB., Lundborg G. (2001) Use of tubes in peripheral nerve repair. *Neurosurgery Clinics of North America*, 1:341-352.
- Gómez-Pinedo U., Chávez-Delgado E., López-Dellamary F., Mora-Galindo J., González-Pérez O., Martínez-Contreras A., Bañuelos-Pineda J., Garzón P., Navarro-Ruiz A., Luquín S., Macías-Islas M., García-Estrada J. (2001) Utilización de prótesis de quitosa y silicona en la regeneración del nervio ciático axotomizado de ratas. *Arch Neurocienc (Méx)*, 6(4):184-193.
- Haipeng G., Yinghui Z., Jianchun L., Yandao G., Nanming Z., Xiufang Z. (2000) Studies on nerve cell affinity of chitosan-derived materials. *J Biomed Mater Res*, 52(2):285-95.
- Wei X., Lao J., Gu YD. (2003) Bridging peripheral nerve defect with chitosan-collagen film. *Chin J Traumatol*, 6(3):131-4.
- Ijkema-Paassen J., Jansen K., Gramsbergen A., Meek MF (2004) Transection of peripheral nerves, bridging strategies and effect evaluation. *Biomaterials*, 25:1583-1592.
- Kas HS. (1997) Chitosan: properties, preparations and application to microparticulate systems. *J Microencapsul*, 14(6):689-711.
- Suzuki M., Itoh S., Yamaguchi I., Takakuda K., Kobayashi H., Shinomiya K., Tanaka J. (2003) Tendon chitosan tubes covalently coupled with synthesized laminin peptides facilitate nerve regeneration in vivo. *J Neurosci Res*, 72(5):646-59.
- Rosales-Cortes M., Peregrina-Sandoval J., Bañuelos-Pineda J., Sarabia-Estrada R., Gómez-Rodiles CC., Albarran-Rodríguez E., Zaitseva GP., Pita-Lopez ML, 2003. Immunological study of a chitosan prótesis in the sciatic nerve regeneration of the axotomized dog. *J of Biom Appl*, 18:15-23. Yamaguchi I., Itoh S., Suzuki M., Osaka A., Tanaka J. (2003) The chitosan prepared from crab tendons: II. The chitosan/apatite composites and their application to nerve regeneration. *Biomaterials*, 24(19):3285-92.
- Yang .F, Li X., Cheng M., Gong Y., Zhao N., Zhang X., Yang Y. (2002) Performance modification of chitosan membranes induced by gamma irradiation. *J Biomater Appl* 16(3):215-26.

Proyecto No, 29604-z, realizado con financiamiento de la Secretaría de Educación Pública -Subsecretaría de Educación Superior e Investigación Científica- Dirección General de Educación Superior. Convenio: 2003-14-001-016 y PROMEP/103.5/05/1705