



UNIVERSIDADE DA CORUÑA

**Modelo experimental de injerto nervioso  
acelular como soporte para células  
troncales mesenquimales en la transferencia  
del nervio frénico para la reparación de  
lesiones selectivas de C5 y C6 de plexo  
braquial**

**Alba González Rodríguez**

Universidade da Coruña

Facultad de Ciencias de la Salud

Departamento de Fisiología, Medicina y Ciencias Biomédicas

A Coruña, 2021

**Modelo experimental de injerto nervioso acelular  
como soporte para células troncales mesenquimales  
en la transferencia del nervio frénico para la  
reparación de lesiones selectivas de C5 y C6 de plexo  
braquial**

**Autora: Alba González Rodríguez**

Codirectora: María del Carmen Arufe Gonda, PhD

Codirectora: Nerea Comellas Melero, MD, PhD

Grupo de Investigación: Terapia Celular y Medicina Regenerativa

Universidade da Coruña

Facultad de Ciencias de la Salud

Departamento de Fisiología, Medicina y Ciencias Biomédicas

A Coruña, 2021





Dña. M<sup>a</sup> del Carmen Arufe Gonda, PhD, Profesora Titular en el Dpto. de Fisiología, Medicina y Ciencias Biomédicas de la Facultad de Ciencias de la Salud de la Universidad de A Coruña y Dña. Nerea Comellas Melero, MD, PhD, Especialista en el Dpto. de Cirugía Plástica del Complejo Hospitalario Universitario de A Coruña.

**CERTIFICAN:**

Que la presente memoria de tesis titulada: “Modelo experimental de injerto nervioso acelular como soporte para células troncales mesenquimales en la transferencia del nervio frénico para la reparación de lesiones selectivas de C5 y C6 de plexo braquial” presentada por Dña. Alba González Rodríguez para optar al grado de Doctora, fue realizada bajo nuestra dirección en el Dpto. de Fisiología, Medicina y Ciencias Biomédicas de la Facultad de Ciencias de la Salud de la Universidad de A Coruña y cumple todo los requisitos de originalidad y rigor científico necesarios para su defensa.

En A Coruña, 18 de octubre de 2021

Asdo. Nerea Comellas Melero

Asdo. M<sup>a</sup> del Carmen Arufe Gonda



*A mis abuelos,  
por enseñarme lo más importante.*



## Agradecimientos

En primer lugar me gustaría dar las gracias a las directoras de esta tesis. A la Dra. M<sup>a</sup> del Carmen Arufe por su colaboración como directora, pero sobre todo por su paciencia, lo que ha hecho posible que este trabajo pudiese salir adelante. A mi mentora, la Dra. Nerea Comellas por todo su apoyo, no sólo durante la realización de este trabajo, sino durante toda mi formación como especialista a través de su estímulo constante, su experiencia y su ejemplo.

Agradecer a todo el personal de la Unidad de Cirugía Experimental y al Instituto de Investigación Biomédica de A Coruña (INIBIC) su ayuda durante la realización del trabajo de investigación, especialmente a los doctores Alberto Centeno Cortés y Juan Antonio Fafián Labora, por estar siempre que los necesité.

También quiero agradecer su apoyo a mis compañeros del Servicio de Cirugía Plástica, en especial a los doctores Francisco Javier Pacheco Compañía y Sara Alicia González Porto, por ser mucho más que compañeros.

Finalmente me gustaría dar las gracias a mis amigos, por mantenerme cuerda y a mi familia, por su cariño y apoyo incondicional, a mis padres Pepe y Adriana y a Daniel, porque siempre están ahí.





## Resumen

El objeto de este proyecto de investigación ha sido desarrollar un modelo experimental para lesiones selectivas preganglionares del tronco superior del plexo braquial mediante la reparación basada en una transferencia del nervio frénico para el nervio musculocutáneo y esclarecer, mediante un análisis comparativo, las diferencias en los resultados obtenidos tras la interposición de tres tipos de injertos nerviosos diferentes en la reparación de la lesión; al mismo tiempo que pretendemos incorporar una opción de reconstrucción mediante interposición en la lesión de tejido nervioso acelular como soporte estructural para un cultivo de células troncales mesenquimales procedentes de médula ósea.

42 ratas Wistar-Lewis se sometieron a una lesión de las raíces C5 y C6 en la extremidad anterior derecha mediante la escisión de un segmento de 3 mm de ambas raíces a nivel del agujero intervertebral, seguido de una transferencia del nervio frénico al nervio musculocutáneo asociado con la interposición de tres tipos de injerto nervioso: grupo control (autoinjerto), grupo experimental A (tejido nervioso acelular) y grupo experimental B (tejido nervioso acelular + células troncales mesenquimales). Las ratas se distribuyeron aleatoriamente en los grupos.

Mediante la reparación con células troncales mesenquimales incorporadas a tejido nervioso acelular buscamos incrementar el potencial de recuperación que tiene de manera

aislada el injerto acelular, tratando de equipararlo a los resultados obtenidos con el injerto autólogo. El objetivo es lograr un tejido que permita minimizar la morbilidad quirúrgica, puesto que no haría necesario sacrificar tejido nervioso funcional y constituya un banco ilimitado de tejido en los casos en los que no existen nervios donantes.

Después de 12 semanas se realizó un registro electrofisiológico para medir la amplitud y latencia del potencial de acción nervioso y del potencial de acción motor compuesto. El injerto de nervio se estudió mediante microscopía electrónica, el músculo bíceps mediante análisis histológico y la mitad proximal del injerto nervioso (grupo experimental B) mediante análisis de fluorescencia.

Se encontraron reducciones estadísticamente significativas en la latencia del potencial de acción motor compuesto entre el grupo control y ambos grupos experimentales y aumentos en la amplitud del potencial de acción motor compuesto entre los grupos control y experimental B, así como en el grosor de la vaina de mielina entre los grupos control y ambos grupos experimentales y en el área de la vaina de mielina entre los grupos control y experimental A ( $P < 0.05$ ). No se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre los grupos experimentales A y B.

**Palabras clave:** Plexo braquial, reinervación, transferencia nerviosa del nervio frénico ipsilateral, injerto nervioso acelular, células troncales mesenquimales procedentes de médula ósea.

## Resumo

O obxecto deste proxecto de investigación ten como finalidade desenvolver un modelo experimental para lesións preganglionares selectivas do tronco superior do plexo braquial mediante a reparación baseada nunha transferencia do nervio frénico ao nervio musculocutáneo e aclarar, mediante unha análise comparativa, as diferenzas nos resultados obtidos despois da interposición de tres tipos diferentes de enxertos nerviosos na reparación da lesión; Ao mesmo tempo, pretendemos incorporar unha opción de reconstrución interpoñendo na lesión tecido nervioso acelular como soporte estrutural para un cultivo de células troncais mesenquimais da medula ósea.

42 ratas Wistar-Lewis foron sometidas a una lesión nas raíces C5 e C6 no membro anterior dereito por escisión dun segmento de 3 mm de ambas raíces ao nivel do foramen intervertebral, seguido da transferencia do nervio frénico ao nervio musculocutáneo asociado a interposición de tres tipos de enxerto nervioso: grupo control (autoenxerto), grupo experimental A (tecido nervioso acelular) e grupo experimental B (tecido nervioso acelular + células troncais mesenquimais). As ratas distribuíronse aleatoriamente nos grupos.

A reparación con células nai mesenquimais incorporadas ao tecido nervioso acelular ten como obxectivo aumentar o potencial de recuperación do enxerto acelular illado, intentando igualalo cos resultados obtidos co enxerto autólogo. O obxectivo é

lograr un tecido que permita minimizar a morbilidade cirúrxica, xa que non faría necesario sacrificar o tecido nervioso funcional e constitúa un banco de tecidos ilimitado nos casos en que non hai nervios doadores.

Despois de 12 semanas, realizouse un estudo electrofisiolóxico para medir a amplitude e a latencia do potencial de acción nervioso e do potencial de acción motor composto. O enxerto nervioso estudouse mediante microscopía electrónica, o músculo bíceps mediante análise histolóxico e a metade proximal do enxerto nervioso (grupo experimental B) mediante análise de fluorescencia.

Atopáronse reducións estatisticamente significativas na latencia do potencial de acción motor composto entre o grupo control e os dous grupos experimentais e aumentos na amplitude do potencial de acción motor composto entre o control e o grupo experimental B, así como no espesor da vaiña de mielina entre os grupos control e os dous grupos experimentais e na área da vaiña de mielina entre os grupos control e experimental A ( $P < 0.05$ ). Non se atoparon diferenzas estatisticamente significativas entre os grupos experimentais A e B.

**Palabras clave:** plexo braquial, reinervación, transferencia ipsilateral de nervio frénico, enxerto de nervio acelular, células troncais mesenquimais da medula ósea.

## Abstract

The object of this research project aims to develop an experimental model for selective preganglionic lesions of the upper trunk of the brachial plexus through repair based on a transfer of the phrenic nerve to the musculocutaneous nerve and to clarify, through a comparative analysis, the differences in the results obtained after the interposition of three different types of nerve grafts in the repair of the injury; At the same time, we seek to achieve a reconstructive option by interpositioning in the lesion the acellular nerve tissue as a structural support for a culture of mesenchymal stem cells from bone marrow.

42 Wistar-Lewis rats underwent a C5-C6 lesion in the right forelimb by excising a 3 mm segment from both roots at the level of the intervertebral foramen, followed by a phrenic nerve transfer to the musculocutaneous nerve associated with the interposition of a three types of nerve graft: control group (autograft), experimental group A (acellular nervous tissue) and experimental group B (acellular nervous tissue + mesenchymal stem cells). The rats were randomly distributed into the groups.

Repair with mesenchymal stem cells incorporated into acellular nervous tissue aims to increase the recovery potential of the acellular graft in isolation, trying to match it with the results obtained with the autologous graft. The objective is to achieve a tissue that allows surgical morbidity to be minimized, since it would not make it necessary to

sacrifice functional nervous tissue and constitutes an unlimited tissue bank in cases in which there are no donor nerves.

After 12 weeks, an electrophysiological record was performed to measure the amplitude and latency of the nerve action potential and the compound motor action potential. Nerve graft was studied by electron microscopy, the biceps muscle by histological analysis and the proximal half of the nerve graft (experimental group B) by fluorescence analysis.

Statistically significant reductions were found in latency of the compound motor action potential between control group and both experimental groups and increases in the amplitude of the compound motor action potential between groups control and experimental B, as well as in the thickness of the myelin sheath between control group and both experimental groups and in the area of the myelin sheath between groups control and experimental A ( $P < 0.05$ ). No statistically significant differences have been found between experimental groups A and B.

**Key words: Brachial plexus, reinnervation, ipsilateral phrenic nerve transfer, acellular nerve graft, mesenchymal stem cells from bone marrow.**

# Índice

<b>Introducción .....</b>	<b>1</b>
Justificación del proyecto .....	3
<b>Antecedentes .....</b>	<b>7</b>
Anatomía nerviosa .....	7
Anatomía del plexo braquial murino .....	7
Anatomía del nervio periférico .....	10
Clasificación de las lesiones del nervio periférico .....	12
Técnicas de reparación nerviosa microquirúrgicas .....	14
Neurorrafia epineural .....	15
Neurorrafia perineural .....	16
Injerto nervioso .....	17
Transferencias nerviosas .....	20
Tejido nervioso acelular .....	22
Células troncales mesenquimales en la reparación nerviosa .....	24
<b>Objetivos del estudio .....</b>	<b>27</b>
<b>Material y métodos .....</b>	<b>29</b>
Animal de experimentación .....	29
Condiciones de los animales .....	29
Diseño experimental .....	31
Células troncales mesenquimales .....	33
Tejido nervioso acelular .....	35



---

Procedimiento quirúrgico .....	38
Postoperatorio.....	43
Recogida de datos .....	44
Eutanasia .....	50
Aspectos éticos.....	51
Punto final humanitario. Modo de aplicación .....	51
<b>Resultados .....</b>	<b>53</b>
Registro electrofisiológico.....	54
Análisis histológico .....	58
Microscopía electrónica.....	61
<b>Discusión .....</b>	<b>67</b>
<b>Conclusiones.....</b>	<b>73</b>
<b>Bibliografía.....</b>	<b>75</b>
<b>Anexo A.....</b>	<b>91</b>
<b>Anexo B .....</b>	<b>103</b>
<b>Anexo C .....</b>	<b>107</b>

---

## Glosario de abreviaturas

<b>CTM</b>	Células troncales mesenquimales
<b>DiI</b>	Colorante de indocarbocianina
<b>NAP</b>	Potencial de acción nervioso
<b>CMAP</b>	Potencial de acción motor compuesto
<b>bFGF</b>	Factor de crecimiento de fibroblastos básico
<b>VEGF</b>	Factor de crecimiento endotelial vascular
<b>G-CSF</b>	Factor estimulante de colonias de granulocitos
<b>TGF-<math>\beta</math></b>	Factor de crecimiento transformante beta
<b>CNTF</b>	Factor neurotrófico ciliar
<b>PHBHHx</b>	Poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyhexanoate)
<b>RPMI</b>	Roswell Park Memorial Institute
<b>PBS</b>	Tampón fosfato salino
<b>DMSO</b>	Dimetilsulfóxido
<b>HBSS</b>	Solución salina equilibrada de Hanks
<b>OCT</b>	Temperatura de corte óptima
<b>DAPI</b>	4',6-diamidino-2-fenilindol
<b>SPURR</b>	Resina epoxi de baja viscosidad
<b>SPSS</b>	Paquete estadístico para ciencias sociales
<b>SD</b>	Desviación estándar
<b>HE</b>	Hematoxilina eosina
<b>FNTC</b>	Factor neurotrófico ciliar



# Introducción

La lesión del plexo braquial es una patología crónica devastadora para el ser humano, puesto que ocasiona una limitación tanto sensitiva como motora de la extremidad superior, mermando en un alto grado la capacidad del individuo para el desarrollo de una actividad laboral normal y limitando en gran medida su autonomía personal y su calidad de vida<sup>1</sup>. En muchas ocasiones, en función del nivel de la lesión, puede asociarse con la presencia de dolor crónico de características neuropáticas o alteraciones disautonómicas.

Las lesiones selectivas de las raíces C5 y C6 son extremadamente limitantes porque afectan al control del hombro por la pérdida de los nervios supraescapular y axilar y a la flexión del codo, por la pérdida del nervio musculocutáneo<sup>2</sup>. Estos tres nervios son de vital importancia para el correcto funcionamiento de las extremidades superiores.

Numerosos autores consideran la reparación de la flexión del codo y la estabilización del hombro como prioritarias en la reparación de las lesiones del plexo braquial, seguidas de la extensión del codo, la abducción del brazo, la extensión de la muñeca y los dedos, la flexión de la muñeca y los dedos y por último el restablecimiento de las funciones derivadas del nervio cubital en la mano<sup>3</sup>.

---

Es una patología que se produce en su mayor parte por accidentes de tráfico, accidentes deportivos o accidentes laborales, por lo que afecta a población joven y activa, lo que hace que sus consecuencias sociales y económicas sean extremadamente altas<sup>4</sup>.

Hasta la década de los años 70 las técnicas quirúrgicas existentes para el tratamiento de las lesiones del plexo braquial eran extremadamente rudimentarias. Las opciones terapéuticas combinaban la artrodesis, con la amputación de la extremidad afectada y la colocación de prótesis y ortesis, obteniéndose una pobre mejora funcional. No fue hasta la aparición de las técnicas descritas por Millesi<sup>5</sup> de injerto nervioso fascicular cuando se comenzaron a desarrollar nuevas estrategias terapéuticas para el tratamiento de esta patología, proporcionando resultados esperanzadores. A partir de aquí se implementaron nuevas técnicas diagnósticas y quirúrgicas mucho más agresivas, asociadas a una importante comorbilidad secundaria, como las transferencias tendinosas o las neurotizaciones, que a pesar de las mejoras proporcionadas no han logrado un restablecimiento completo de la función de la extremidad<sup>2,6</sup>.

## Justificación del proyecto

La lesión traumática del plexo braquial supone un gran reto quirúrgico. En numerosas ocasiones nos enfrentamos a una lesión de difícil abordaje, asociada a pérdida de tejido nervioso o a una lesión nerviosa proximal por elongación o arrancamiento que imposibilita la neurorrafia simple. En los casos de pérdida de tejido nervioso, la neurorrafia con interposición de injertos nerviosos es una de las opciones terapéuticas más utilizadas. Sin embargo la longitud de los injertos nerviosos determinará la viabilidad de dicha técnica. En aquellos casos en los que el defecto nervioso sea superior a 3-4 cm, el pronóstico de la reinervación mediante injertos nerviosos es precario<sup>7-9</sup>, lo que hace necesario plantear otras opciones como las neurotizaciones intra o extraplexuales<sup>10-12</sup>. Existen estudios que sugieren que esto puede ser debido al papel que juega la senescencia que sufren las células de Schwann en los injertos de gran longitud<sup>13</sup>, por lo que el uso de células madre o ciertos factores de crecimiento pueden tener un papel positivo para contrarrestar este hecho<sup>14</sup>.

Otra de las limitaciones para la reparación mediante neurorrafia simple, asociadas o no a la interposición de injertos nerviosos, que conduce a la necesidad de reparación mediante neurotizaciones, se halla en el nivel de la lesión, siendo las lesiones preganglionares subsidiarias con mucha frecuencia de reparación mediante estas técnicas<sup>2</sup>, ya que, aunque existen múltiples trabajos orientados a lograr la reparación nerviosa actuando directamente sobre la raíz afecta, los resultados todavía no son nada alentadores<sup>15</sup>.

Por último es imprescindible resaltar el factor limitante que supone el tejido nervioso autólogo que se emplea como donante para la realización de los injertos nerviosos, por la pequeña cantidad de nervios donantes disponibles y por la morbilidad que se asocia a la zona donante al tener que sacrificar un nervio sano funcional. Por este motivo se impone la necesidad de buscar alternativas terapéuticas para salvar el defecto nervioso, como por ejemplo con el uso de injertos nerviosos acelulares de manera aislada o como soporte para células troncales mesenquimales, que aportan una fuente ilimitada de tejido<sup>16</sup>. El reto está en conseguir un tejido que aporte un resultado equiparable a los injertos autólogos.

En este trabajo, se estudió en un modelo animal de rata de reparación de una lesión de C5 y C6 del plexo braquial mediante la transferencia del nervio frénico ipsilateral para la reinervación del nervio musculocutáneo, las diferencias en la reinervación existentes entre el uso como injerto de tres tipos de tejido nervioso:

- tejido nervioso autólogo (autoinjerto),
- tejido nervioso heterólogo acelular (aloinjerto descelularizado),
- tejido nervioso heterólogo acelular como soporte para la adición de células troncales mesenquimales procedentes de médula ósea (aloinjerto descelularizado asociado a CTM).

Por la existencia de estudios que describen las similitudes existentes entre el plexo braquial murino y el humano, se ha empleado la rata Wistar como modelo válido para el estudio de la patología del plexo braquial, tanto congénita como traumática<sup>17,18</sup>.

Fueron seleccionadas para realizar el estudio células troncales mesenquimales procedentes de médula ósea de ratas Wistar debido a su fácil acceso y a la existencia de múltiples estudios en modelo animal que avalan positivamente sus resultados en el proceso de reinervación<sup>19,20</sup>.

Para conseguir los objetivos propuestos en este trabajo se realizaron estudios funcionales, neurofisiológicos y anatomopatológicos en los grupos que describiremos con detalle en los apartados sucesivos, y se realizaron análisis estadísticos de los resultados obtenidos empleando el software SPSS<sup>20,21</sup>.





# **Antecedentes**

## **Anatomía nerviosa**

### **Anatomía del plexo braquial murino**

El plexo braquial de la rata Wistar presenta grandes similitudes anatómicas con el plexo braquial humano. Se forma a partir de los ramos anteriores de las raíces espinales de C5 a T1. Se divide en tres troncos: superior, medio e inferior; que a su vez se subdividen cada uno de ellos en anterior y posterior. De la unión de estas divisiones, se forman tres fascículos: superior, inferior y posterior, que dan lugar a los nervios terminales que se encargan de la inervación sensitivo-motora de la extremidad anterior.

El tronco superior está formado por las raíces C5 y C6 y un ramo comunicante de C4; el tronco medio lo forma de manera aislada C7; por último, el tronco inferior está formado a partir de las raíces C8 y T1 (Figura 1).

El fascículo superior deriva de la división anterior del tronco superior, y da lugar al nervio musculocutáneo y a otros nervios colaterales como el supraescapular; el fascículo inferior está constituido por las divisiones anteriores de los troncos medio e inferior, dando lugar a los nervio mediano y cubital; y el fascículo posterior deriva de la unión de las divisiones posteriores, originando los nervios axilar y radial.

---

El nervio musculocutáneo entra en la extremidad anterior entre los músculos coracobraquial y la porción corta del bíceps braquial. Continúa dando ramas musculares hasta su llegada al antebrazo como nervio cutáneo lateral del antebrazo. Su disección puede realizarse desde su porción más proximal en su salida del plexo braquial, o por el contrario puede localizarse a través de una incisión en la región medial del brazo, en el borde medial del músculo bíceps. En relación al nervio musculocutáneo existe una pequeña variación anatómica si lo comparamos con el plexo humano ya que, el plexo murino tiene una aportación de la raíz C7, y el humano solo presenta aportaciones de las raíces C5 y C6<sup>22</sup>.

Los nervios axilar y radial son fácilmente identificables a nivel axilar, como ramas terminales del plexo braquial al igual que los nervios mediano y cubital. Para acceder a los primeros sin necesidad de realizar una disección completa del plexo, puede realizarse un abordaje a través del surco deltopectoral, seccionando tras la disección del surco, la inserción distal de músculo pectoral menor. Por el contrario, para acceder a los nervios mediano y cubital el abordaje más sencillo se realiza distal, a nivel de la flexura antebraquial de la extremidad anterior, encontrándose mediales al músculo bíceps.

El nervio frénico se origina fundamentalmente de la raíz C4 y recibe aportaciones de la raíz C5. Desciende sobre la superficie del músculo escaleno anterior, anterior al plexo braquial, y se introduce en el tórax hasta aportar la inervación al diafragma<sup>23</sup>.

Las relaciones vasculares principales son con las arterias axilar y vertebral, que discurren inferior y anterior al plexo, respectivamente. Las relaciones musculares, se producen principalmente con los músculos pectorales mayor y menor. Se diferencia del plexo humano de manera notable en cuanto a su relación con la clavícula, puesto que no la cruzan, sino que se localizan enteramente en posición infraclavicular<sup>18</sup>. Esto último es

de vital importancia a la hora de plantear un posible abordaje quirúrgico a través del surco deltopectoral<sup>17</sup>.



**Figura 1:** Imagen anatómica de la disección del plexo braquial murino donde se muestran todas las raíces nerviosas, los troncos principales, las divisiones y troncos secundarios, que darán origen a los nervios del miembro superior.

## **Anatomía del nervio periférico**

El nervio periférico está formado por la agrupación de fibras nerviosas. Estas fibras nerviosas pueden transmitir información sensitiva, motora o vegetativa. Cada fibra nerviosa está compuesta por axones, que pueden ser prolongaciones de los somas neuronales de las motoneuronas del asta anterior de la médula espinal, de las neuronas sensitivas localizadas en los ganglios espinales o de las neuronas del sistema autónomo. Su función principal es la transmisión de impulsos nerviosos, tanto de manera anterógrada como retrógrada.

Las fibras nerviosas pueden ser de dos tipos; fibras mielínicas o fibras amielínicas. Estas fibras se diferencian en la relación que tienen las células de Schwann con los axones, lo que se traduce en una variación en la velocidad de conducción, siendo más rápida en las fibras mielínicas. Las fibras mielínicas pueden ser de tipo  $\alpha$  o  $\beta$ . Se caracterizan porque cada célula de Schwann rodea a un axón, formado con su membrana a su alrededor una vaina de mielina. Por el contrario, en las fibras amielínicas, que son de tipo C, cada célula de Schwann envuelve a múltiples axones.

Los nódulos de Ranvier son el espacio que existe entre las células de Schwann que están rodeando a cada uno de los axones. Su distancia determina la velocidad de conducción del nervio, ya que en estos espacios es donde se encuentran los canales iónicos donde se generan las diferencias de potencial que permiten el impulso nervioso.

Las fibras nerviosas se agrupan para formar fascículos. El tejido conectivo que se distribuye entre las fibras nerviosas dentro de cada fascículo se denomina endoneuro.

---

Cada fascículo está rodeado de una capa conectiva denominada perineuro. Los fascículos agupados dan lugar al nervio, que se halla rodeado del epineuro.

La disposición de los fascículos dentro del nervio, a pesar de poder presentar variaciones, de manera general presenta una topografía relativamente constante, lo que nos permite realizar las reparaciones nerviosas de funciones específicas de cada nervio<sup>24,25</sup>.

La vascularización de los nervios se produce de dos formas. Puede ser a través de un plexo vascular que se halla en el espacio perineural y endoneural, o a través de vasos que se disponen longitudinalmente a lo largo del epineuro. Además existe un sistema linfático interfascicular y un sistema de nervi nervorum.

---

## Clasificación de las lesiones del nervio periférico

Seddon en 1943 realizó una clasificación de las lesiones del nervio periférico basándose en su pronóstico, catalogándolas en tres grupos: neurapraxia, axonotmesis y neurotmesis. En 1951 Sunderland amplía esta clasificación incluyendo otras dos categorías nuevas<sup>26,27</sup>.

- La neurapraxia, que se corresponde con el grado I de Sunderland, está producida por una desmielinización focal de las fibras nerviosas, lo que condiciona un bloqueo en la conducción. Es una lesión que se recupera de manera completa y espontáneamente.
- La axonotmesis se produce cuando existe una lesión del axón, el endoneuro y el perineuro, manteniéndose intacto el epineuro. La recuperación no siempre es espontánea ni completa. Según Sunderland se puede subdividir en tres grados:
  - Grado II: Solo existe lesión axonal.
  - Grado III: A la lesión axonal se asocia lesión del endoneuro.
  - Grado IV: Existe lesión del axón, el endoneuro y el perineuro, permaneciendo íntegro tan solo el epineuro.
- La neurotmesis implica una sección completa del nervio, que si no se repara de manera quirúrgica nunca va a lograr una reinervación espontánea. Se corresponde con el grado V de Sunderland.

En 1988 Mackinnon y Dellon. incluyen un grado VI a la clasificación, que implica la presencia dentro de un mismo nervio de varios de los grados anteriores<sup>28</sup>.



---

## Técnicas de reparación nerviosa microquirúrgicas

A pesar de que la sutura nerviosa es una técnica aparentemente poco exigente dentro de las técnicas empleadas en microcirugía, la correcta manipulación del tejido nervioso es fundamental para alcanzar los objetivos deseados. Cualquier tipo de sutura nerviosa requiere una manipulación extremadamente delicada del tejido, evitando la compresión o la tracción excesiva, para minimizar el daño axonal, por lo que la sujeción del nervio debe realizarse a través de la membrana epineural. Un factor técnico fundamental en la reparación del nervio periférico es la coaptación de cada uno de los fascículos, por lo que es imprescindible un conocimiento en detalle de la anatomía fascicular<sup>5</sup>.

Generalmente se emplean hilos de monofilamento no reabsorbible (nylon) de 9/0, 10/0 u 11/0 en función del calibre del nervio que vayamos a reparar y las suturas que se realicen no deben tener tensión en absoluto debido a la retracción que se produce por la cicatrización, lo que podría producir en el peor de los casos una rotura de la sutura. Existen grupos que prefieren el uso de adhesivos de fibrina en lugar de la sutura, o la asociación de ambas técnicas. La literatura no muestra diferencias entre el uso de ambas técnicas, por lo que el criterio del cirujano es lo que va a primar en la selección de la misma<sup>29</sup>.

Existen varias técnicas para realizar la sutura que iremos detallando en los siguientes apartados.

## **Neurorrafia epineural**

La neurorrafia directa pretende lograr la coaptación de ambos extremos del nervio seccionado, respetando la orientación de las fibras, para restablecer la continuidad de las mismas. La sutura se realiza mediante puntos simples en el epineuro. Es la técnica de elección cuando es posible realizarla<sup>30</sup>.

En primer lugar se debe realizar una buena disección del nervio, tratando de traumatizarlo lo menos posible, evitando comprimirlo. Lo ideal, como ya se ha mencionado con anterioridad, es realizar la tracción para su manipulación sobre la membrana epineural, para evitar dañar los axones. Una vez que se encuentre expuesta una longitud de nervio adecuada, se procede a colocar un material de contraste que facilite su identificación. La sección se realizará de manera ideal con una tijera recta fina, a poder ser microquirúrgica. Para unos resultados óptimos, es preferible realizar la neurorrafia de manera precoz.

Existen numerosas técnicas descritas para la sutura, pero en todas ellas el objetivo es lograr la coaptación de ambos extremos, respetando en la medida de lo posible la orientación de las fibras nerviosas. La sutura se realizará mediante puntos simples en la membrana epineural, proporcionando una tensión suficiente para afrontar ambos extremos y evitando estrangularlo, puesto que puede conducir a la formación de neuromas.

## **Neurorrafia perineural**

La neurorrafia perineural implica suturar de manera independiente cada uno de los fascículos a través de la parte más externa del perineuro, lo que hace necesaria la disección fascicular antes de comenzar. Este tipo de sutura ha generado grandes controversias debido a la fibrosis que produce la disección intraneural extensa que se debe realizar y al aumento de material de sutura necesario<sup>31,32</sup>. Actualmente su interés radica en su uso en las transferencias nerviosas, ya que nos permite suturar el fascículo que nos interesa transferir al que nos interesa reparar.

Para realizar una neurorrafia fascicular debemos realizar, antes de seccionar el nervio, la disección de los fascículos del mismo. Para ello se emplea una tijera microquirúrgica de disección curva roma o una pinza de relojero curva, evitando en la medida de lo posible dañar el perineuro. La sutura debe realizarse sobre la parte más externa del perineuro, para evitar dañar los axones y disminuir en la medida de lo posible la cantidad de sutura que queda dentro del nervio. Dado el calibre de los nervios en la rata y el escaso tejido conectivo que presentan, este procedimiento difícilmente puede llevarse a cabo en este modelo.

## Injerto nervioso

El primer injerto nervioso aparece descrito en la literatura por Seddon en 1947<sup>9</sup>. Se han intentado emplear tejidos autólogos como sustituto al tejido nervioso, como venas o fibras musculares (Figura 2), pero los resultados eran muy deficitarios en comparación con el autoinjerto<sup>33</sup>.

Las técnicas de sutura del injerto nervioso son idénticas a las expuestas anteriormente. Puede realizarse tanto un injerto de todo el nervio o de varios fascículos. Para que los diámetros de los segmentos nerviosos sean lo más concordantes posible, para nervios de pequeño calibre puede emplearse otro nervio de igual calibre o tomar únicamente un fascículo de otro nervio de mayor diámetro. En nervios con un calibre mayor puede realizarse un injerto en cada uno de los fascículos tomando segmentos de un nervio de menos diámetro.

El segmento injertado debe tener una longitud mayor a la del defecto para compensar la retracción que se produce en los extremos y evitar la tensión en la sutura. Lo recomendado es emplear un segmento de en torno a un 10% mayor de la longitud del defecto (Figura 3).

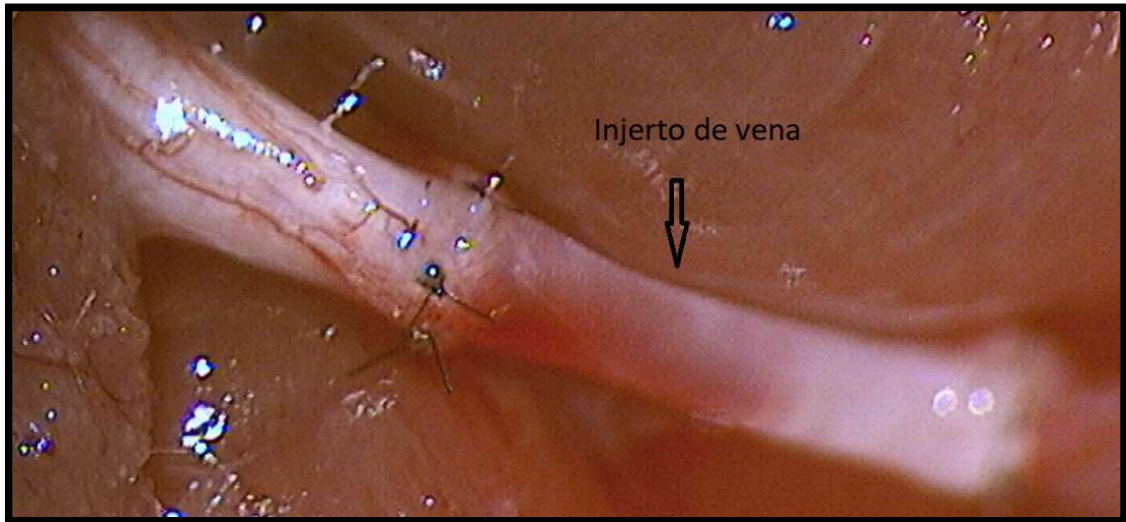
No hay consenso sobre la longitud máxima que puede tener un injerto de nervio para que sea funcional. Existen publicaciones con resultados relativamente favorables con injertos de hasta 20 cm<sup>34</sup>. Grupos como el de Mackinnon et al. estiman que los mejores resultados se obtienen con injertos menores o iguales a 6 cm, siendo los injertos pequeños y delgados los que tienen mejores resultados funcionales debido a una revascularización

---

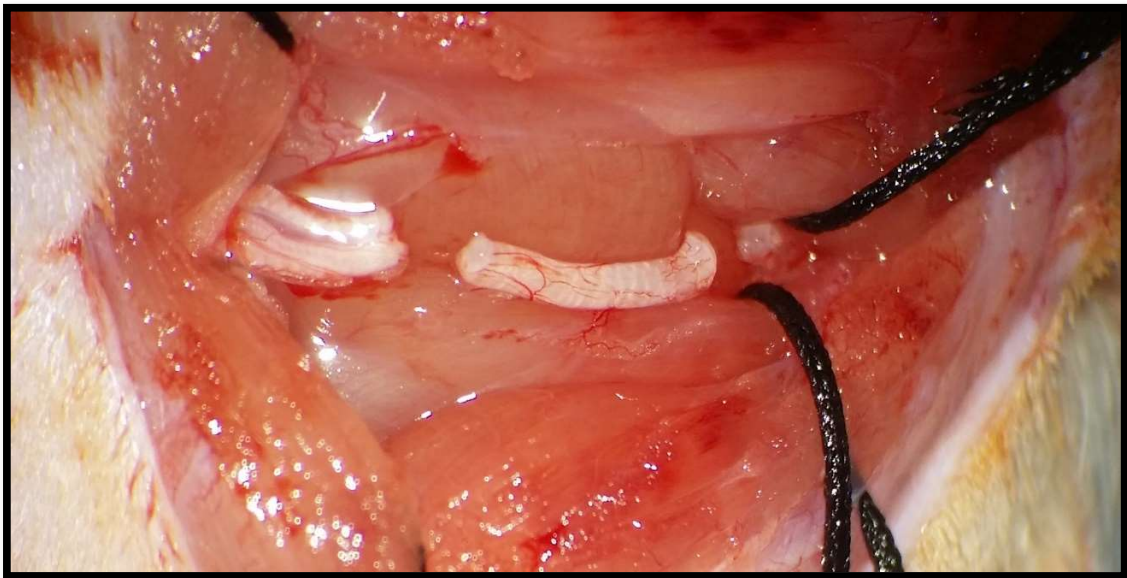
más fácil<sup>25</sup>. Se propuso por varios autores el uso de injertos nerviosos vascularizados para defectos mayores a 6 cm, pero no se han documentado diferencias significativas en los resultados clínicos<sup>35-37</sup>.

Para facilitar la manipulación del injerto, se aconseja marcar uno de los extremos con un punto de nylon o una marca de rotulador, lo que permitirá la identificación del extremo proximal o distal para suturarlo con una correcta orientación en el lado contralateral. La mayoría de los autores recomiendan colocar el injerto nervioso de manera retrograda, es decir, con el extremo proximal colocado en posición distal, para evitar la fuga axonal a través de las ramas laterales del nervio durante el proceso de reinervación.

La principal desventaja de los autoinjertos es la necesidad de sacrificar un nervio funcional para emplearlo como donante, generando otra herida quirúrgica, lo que resulta en morbilidad del sitio donante, cicatrización adicional, la posibilidad de neuromas dolorosos y la prolongación del tiempo quirúrgico<sup>38</sup>. Además, hay donantes limitados disponibles. Los injertos de nervios motores o mixtos son preferibles a los donantes de nervios sensoriales, lo que mejora la regeneración a través de la coaptación<sup>39,40</sup>.



**Figura 2:** Imagen intraoperatoria tomada a través del microscopio quirúrgico de un injerto de vena



**Figura 3:** Imagen intraoperatoria tomada a través del microscopio quirúrgico de un injerto de nervio presentado para su sutura. Nótese la retracción de los extremos y la existencia de una discrepancia de calibre entre el extremo proximal y el injerto.

## Transferencias nerviosas

Las transferencias nerviosas consisten en la sección un nervio donante en su porción distal para suturarlo a la porción proximal del nervio que se pretende reparar. Puede ser transferido tanto el nervio completo como tan solo alguno de sus fascículos. Su uso en las lesiones del plexo braquial está especialmente indicado en las avulsiones, donde la reparación directa no es posible o en lesiones donde el tiempo de reinervación hasta el músculo diana va a ser tan largo que el potencial de recuperación se ve reducido. En este segundo caso se plantean las transferencias distales, que pueden ser termino-terminales o termino-laterales a modo de "supercarga"<sup>41,42</sup>, lo que parece aportar un efecto protector sobre la degeneración muscular hasta que se completa la reinervación<sup>43,44</sup>. Se ha demostrado que en casos en los que existe una denervación crónica del músculo se obtienen mejores resultados empleando transferencias nerviosas que mediante la reparación directa del nervio<sup>45</sup>.

Hasta el momento, existen numerosos procedimientos de transferencia nerviosa descritos en rata como modelo animal para el tratamiento de las lesiones del plexo braquial, tanto selectivas como completas; desde las transferencias intraplexuales con la raíz C7 ipsilateral<sup>21</sup> como las extraplexuales con las transferencias del nervio frénico<sup>21,46</sup>, el nervio espinal accesorio o la raíz C7 contralateral<sup>47-49</sup>. El uso de transferencias nerviosas se asocia a un proceso de plasticidad neuronal que permite la recuperación funcional de la lesión<sup>50-53</sup>.

Existen múltiples alternativas para la reinervación del nervio musculocutáneo en lesiones altas del plexo braquial descritas en la literatura, desde la transferencia del nervio espinal accesorio, el nervio pectoral medial o el nervio toracodorsal, hasta transferencias

---

más complejas como la de la raíz C7 contralateral o la del nervio frénico. En la mayoría de casos es preciso combinar varios tipos distintos de transferencia para obtener unos resultados óptimos<sup>54</sup>.

La transferencia contralateral de C7 es una técnica descrita por primera vez en 1986 por Gu et al., y se planteó como una alternativa optima cuando no existen otros nervios donantes disponibles<sup>47</sup>. En nuestro estudio hemos empleado una variante de un modelo descrito de lesión selectiva de C5 y C6 con reconstrucción mediante transferencia de la raíz C7 ipsilateral.



## Tejido nervioso acelular

Uno de los principales limitantes en la reconstrucción nerviosa es que el tejido donante autólogo necesario para realizar los injertos es finito y además su obtención se asocia a morbilidad añadida. Este es el motivo por el que se han intentado desarrollar durante años múltiples conductos artificiales como sustitutos del nervio. Su problema es que carecen de la conformación tridimensional ideal para el crecimiento nervioso, por lo que su potencial de reinervación es menor que el del autoinjerto, lo que limita su uso a defectos cortos de hasta dos centímetros<sup>55-59</sup>. Los biomateriales se han asociado con múltiples factores de crecimiento, como el bFGF, el VEGF o el G-CSF mejorando sus resultados, pero nunca han logrado equipararse al de los autoinjertos<sup>60-62</sup>. La incorporación de células madre, o células Schwann-like, asociadas a los biomateriales aumenta la eficacia de los mismos y estimula en gran medida el proceso de regeneración<sup>9</sup>. Un ejemplo de ello es el presentado por el grupo de Casañas et al. que asocian el uso de células troncales mesenquimales a neurotubos en un modelo ovino, con resultados favorables<sup>63</sup>.

Durante el proceso de búsqueda de un tejido con unas características y un resultado equiparable al de los autoinjertos, se comenzó a investigar el uso de aloinjertos de cadáver. La primera descripción de un aloinjerto que aparece en la literatura es de 1876, donde se emplea para la reparación de un nervio mediano mediante el uso de un injerto de nervio tibial de cadáver<sup>25</sup>. El problema del uso del aloinjerto es su inmunogeneidad, ya que precisan de inmunosupresión para conseguir un resultado equiparable al del aloinjerto, lo que aumenta el riesgo de desarrollar procesos oncológico o infecciones oportunistas<sup>64</sup>.

---

Como una buena alternativa a los aloinjertos se han desarrollado los aloinjertos acelulares, que se obtienen tras procesar el nervio para eliminar de él las células, manteniendo la estructura tridimensional sin alteraciones, eliminando así la inmunogeneicidad<sup>65</sup>. Existen múltiples protocolos descritos en la literatura cuyo objetivo es eliminar la máxima cantidad de células preservando la arquitectura prácticamente intacta<sup>66,67</sup>. Los procesos de descelularización pueden llevarse a cabo mediante métodos térmicos o mediante el uso de radiación, pero casi todos ellos realizan una extracción química mediante el uso de varios tipos de detergente como el deoxicolato de sodio, el Triton X-100 o el Triton X-200 a diferentes concentraciones. También se ha descrito el uso de soluciones hiperosmolares como la solución hipertónica de cloruro de sodio<sup>55,68-71</sup>.

Se ha demostrado la superioridad del injerto acelular frente a los conductos sintéticos, aunque no han alcanzado los resultados de los autoinjertos<sup>68,72</sup>. Su uso en humanos se ha demostrado seguro<sup>73</sup>, pero debido a la ausencia de células de Schwann su potencial de reinervación se ve limitado a defectos sensitivos menores a 3 cm, teniendo pobres resultados en defectos de nervios motores, mixtos o mayores de 4 cm<sup>13,74</sup>. Este es el motivo por el que se está investigando intensamente su asociación con células madre mediante técnicas de ingeniería tisular, con el objetivo de crear un tejido con al menos el mismo potencial de recuperación que ofrecen los autoinjertos<sup>26,75,76</sup>.

## **Células troncales mesenquimales en la reparación nerviosa**

El concepto de las células troncales mesenquimales provenientes de médula ósea aparece en la literatura por primera vez en la década de los 70s<sup>77,78</sup>. Podemos definir las como una población de células madre de tejido adulto estromal, con capacidad para diferenciarse en otros tipos celulares adultos del tejido conectivo<sup>79,80</sup>. Se trata de una población de células heterogéneas, multipotenciales, autorrenovables, con capacidad de regeneración tisular, que además tienen la capacidad de pasar de un estado de reposo a uno proliferativo y a la inversa<sup>81,82</sup>.

El interés en el uso de células madre provenientes de tejido mesenquimal está incrementándose de manera exponencial en los últimos años, siendo cada vez más frecuentes las líneas de investigación orientadas en este sentido. Existen ya estudios que empiezan a implementar su uso en humanos en lesiones de nervio periférico y médula ósea, como el de Thakkar et al. que emplea CTM provenientes de médula ósea para tratar una lesión de plexo braquial<sup>83</sup>, aunque por el momento la mayoría de publicaciones están orientadas a garantizar su seguridad<sup>9,84</sup>.

Los estudios en animales, sobre todo en modelo murino, son cada vez más extensos. Se han obtenido resultados prometedores en su uso, pero el mecanismo por el cual se obtiene este beneficio no está claro todavía. Se sospecha que pueda tener que ver con una actividad inmunomoduladora, el aporte de factores neurotróficos y el estímulo de neoangiogénesis<sup>4,14,85</sup>. Esto puede estar relacionado con el efecto positivo que se ha visto también al asociar factores de crecimiento como el TGF- $\beta$ , el CNTF o el VEGF a la sutura

---

nerviosa en lesiones de larga evolución<sup>86-88</sup>. Incluso se han objetivado resultados positivos empleando las células troncales directamente en el músculo atrófico en lesiones evolucionadas, así como en casos de avulsiones radiculares, bien directamente en la médula espinal o en la raíz reinsertada<sup>89,90</sup>. Estos resultados son muy esperanzadores, dado que una de las principales limitaciones en la regeneración nerviosa viene determinada por el tiempo transcurrido desde la lesión, fundamentalmente debido a la degeneración del extremo distal del nervio y a la atrofia muscular secundaria<sup>91</sup>.

No existe suficiente evidencia en cuanto a que tipo de célula troncal mesenquimal aporta más beneficios en la regeneración nerviosa, aunque parece existir cierta superioridad en el uso de células provenientes de médula ósea y de tejido adiposo, que puede estar en relación a su mayor capacidad para producir factores paracrinos<sup>92</sup>. En cuanto su uso en la clínica, es cierto que las células provenientes de tejido adiposo son de más fácil acceso, a pesar de que el manejo del tejido es más engorroso<sup>93</sup>. Las células provenientes de médula ósea son de más difícil extracción debido a que su proporción es baja y el procedimiento de extracción es invasivo, requiriendo de al menos sedación<sup>94</sup>.

En la literatura publicada hasta el momento parece obtenerse un efecto beneficioso del uso de células troncales mesenquimales en la regeneración nerviosa. Uno de los motivos aparenta ser su capacidad para diferenciarse en células de Schwann, tanto in vitro como in vivo, así como su capacidad para inducir un aumento en la actividad de las células de Schwann del propio paciente, mejorando la mielinización, supervivencia celular y la actividad neurotrófica<sup>95</sup>. Esto hace necesarios la aplicación de protocolos de diferenciación efectivos adaptados a cada tipo de célula troncal<sup>96</sup>. Grupos como el de Bahat-Stroomza et al. han conseguido la diferenciación de CTM provenientes de médula ósea en células del tejido nervioso funcionales astrocito-like<sup>97</sup>. Se han objetivado efectos sinérgicos en el uso de células troncales combinadas con otros factores como por ejemplo la condroitinasa ABC o el PHBHHx<sup>98,99</sup>.

La gran mayoría de estudio experimentales animales emplean el modelo de nervio ciático por su facilidad en el abordaje, por lo que en el miembro superior, sobre todo en el plexo braquial, su aplicación es más limitada. Hu et al. emplearon un injerto de nervio sembrado con células troncales mesenquimales proveniente de médula ósea de 5 cm para la recuperación del nervio mediano en un modelo de mono con resultados esperanzadores, aproximándose a los resultados obtenidos con el autoinjerto<sup>100</sup>.

Es fundamental realizar un adecuado marcaje de las CTM empleadas en los estudios, lo que nos garantiza la trazabilidad de las mismas y nos permite su estudio tras la implantación en el tejido. Existiendo múltiples protocolos como el de Arufe et al. para conseguir una correcta extracción, caracterización y marcaje de las células<sup>96,101,102</sup>.

# Objetivos del estudio

## Objetivo principal

El objetivo principal de este estudio de investigación es contribuir a esclarecer las diferencias en la reinervación existentes entre el uso de tres tipos de tejido nervioso diferentes en un modelo de reparación de una lesión selectiva preganglionar de las raíces C5 y C6 del plexo braquial mediante la transferencia del nervio frénico ipsilateral asociada a la interposición de los injertos nerviosos para la reinervación del nervio musculocutáneo.

Se valorará la reconstrucción mediante interposición en la lesión de tejido nervioso acelular como soporte estructural para un cultivo de células troncales mesenquimales procedentes de médula ósea en el modelo descrito anteriormente, basándonos en que esta técnica permite minimizar la morbilidad quirúrgica, puesto que no hace necesario sacrificar tejido nervioso funcional autólogo y es un banco ilimitado de tejido en los casos en los que no existan nervios donantes.

## Objetivo secundario

Como objetivo secundario se busca realizar un estudio anatómico que permita describir un abordaje quirúrgico sencillo que facilite la disección para la realización del procedimiento en estudios ulteriores o para el entrenamiento microquirúrgico en cirugía del plexo braquial en modelo murino.



# Material y métodos

## Animal de experimentación

El modelo animal empleado como unidad experimental fue la rata de laboratorio de la línea Wistar-Lewis (LEW) haplotipo RT11 LEW/HanHsd, perteneciente a la especie *Rattus norvegicus*, roedores miomorfos de la familia Muridae.

## Condiciones de los animales

El alojamiento de los animales se realizó en cubetas con tapa de filtro y rack ventilado con unas dimensiones acordes a la Directiva Europea 63/2010, introduciéndose dos animales por cubeta. Se aplicó sustrato absorbente para el suelo de la jaula conformado por virutas de madera. La alimentación se llevó a cabo con pienso de mantenimiento A04 y agua ad libitum. En cada jaula fue incorporado material de enriquecimiento ambiental (Figura 4).

Se respetó el ritmo circadiano de los animales, la iluminación durante las doce horas diurnas fue de unos 120 luxes, se mantuvo una temperatura ambiental lo más próxima a los 20-24°C y una humedad relativa en torno al 55%.



Los animales intervenidos fueron alojados en racks individuales, en una habitación separada durante el periodo de tiempo que dura el postoperatorio, para evitar el estrés del resto de los individuos.



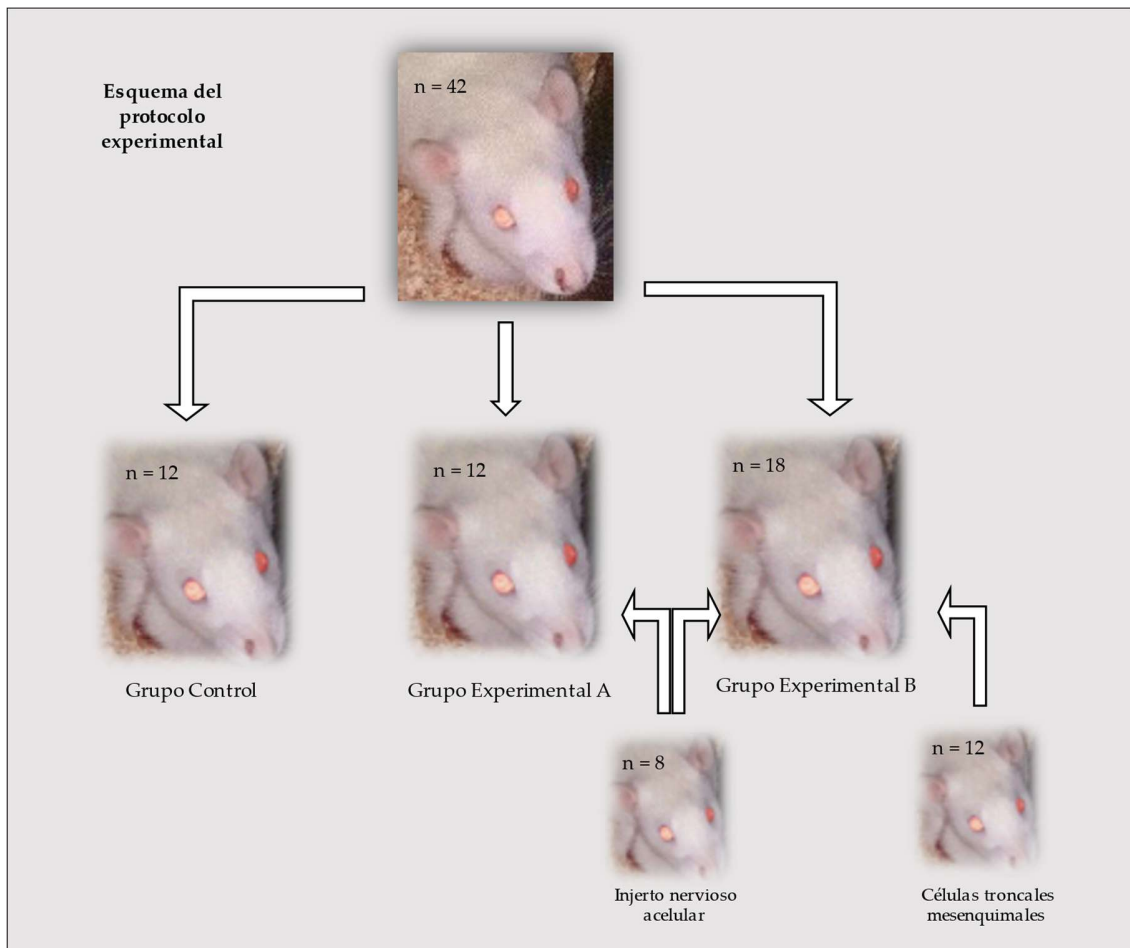
**Figura 4:** Cubetas con tapa de filtro y rack ventilado empleadas para la estabulación de los animales. Cada una de las cubetas es etiquetada con los datos del animal, el grupo experimental al que pertenece y la fecha de intervención.

---

## Diseño experimental

El diseño experimental se llevó a cabo con 62 ratas Wistar-Lewis. Se utilizaron los fémures de 12 ratas hembras de 14 días para obtener las células troncales y se utilizaron 8 ratas hembras de 10 semanas como donantes de tejido nervioso. El protocolo quirúrgico se realizó con 42 ratas macho de  $80 \pm 10$  días, que fueron divididas en tres grupos; 12 ratas en el grupo control, 12 ratas en el grupo experimental A y 18 ratas en el grupo experimental B. Cada uno de los animales fue asignado de manera aleatoria a uno de los grupos del estudio. A todos los ejemplares se les practicó el mismo procedimiento quirúrgico con el fin de producir una **lesión selectiva de las raíces C5 y C6 del plexo braquial** en la extremidad anterior derecha (Figura 5).

El protocolo experimental fue evaluado y aprobado por el comité ético de experimentación animal, así como los ensayos piloto previos, realizados para el cálculo del tamaño muestras y el análisis de la viabilidad del modelo (Anexo B).



**Figura 5:** Esquema representativo del protocolo experimental. En el grupo control se emplea un injerto autólogo, en el grupo A un injerto acelular y en grupo B un injerto acelular asociado a células troncales mesenquimales.

## **Células troncales mesenquimales**

En una primera fase experimental se obtuvieron las células troncales mesenquimales necesarias para el grupo experimental B. Para ello se emplearon las células obtenidas de los huesos largos de las extremidades posteriores (fémur y tibia) de 12 ratas hembra Wistar-Lewis de 14 días que previamente habían sido eutanasiadas mediante asfixia en una cámara de CO<sub>2</sub> con regulador de suministro de gases, a una velocidad de llenado del 20% por minuto, de acuerdo con los protocolos de eutanasia establecidos en la normativa vigente.

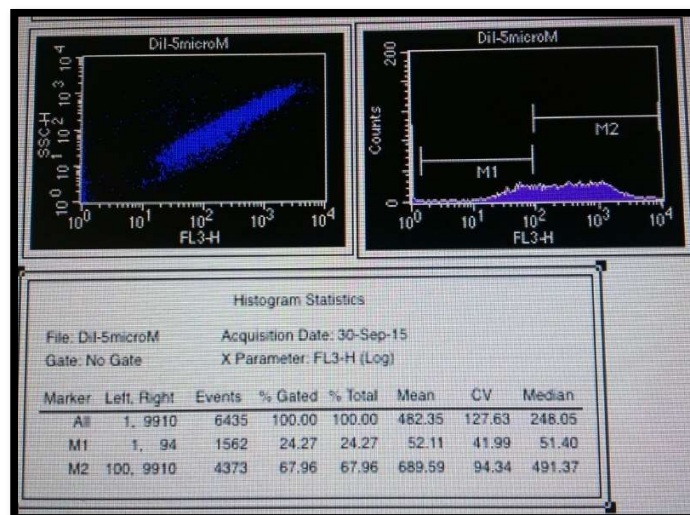
Todo el proceso de manipulación de las células madre desde su extracción se llevó a cabo en condiciones de esterilidad en cabinas de flujo laminar. La extracción de la médula ósea del interior de los huesos largos se realizó mediante técnicas de lavado por arrastre con medio Roswell Park Memorial Institute (RPMI) (Thermo Fisher, Madrid, ES) con suero bovino fetal al 10% (Thermo Fisher, Madrid, ES) y solución antibiótica de penicilina y estreptomina al 1% (Thermo Fisher, Madrid, ES). Una vez obtenida la muestra, se procedió a su cultivo en el mismo medio sobre placas de cultivo celular según los protocolos habituales, empleándose para ello tripsina al 0.25% (Thermo Fisher, Madrid, ES) para realizar los pases celulares y solución fosfato salino (PBS) (Thermo Fisher, Madrid, ES). La incubación se realizó en estufas a 37 °C.

Una vez hubo crecido el número de células necesario en cada una de las placas e inmediatamente antes de su utilización, se realizó el marcaje de las mismas con colorante catiónico lipofílico fluorescente indocarbocianina (DiI) (Thermo Fisher, Madrid, ES). Se empleó una solución stock de DiI en dimetilsulfóxido (DMSO) (Thermo Fisher, Madrid, ES) a una concentración de 2mg/ml para obtener una dilución de DiI al 0.1µM en Hank's

balanced salt solution (HBSS) (Thermo Fisher, Madrid, ES). La concentración óptima empleada se basó en los resultados obtenidos del análisis citométrico de distintas muestras celulares marcadas previamente con diferentes concentraciones de solución, donde se consideró como adecuado un marcaje de al menos un 90% de las células analizadas (Figura 6).

Brevemente, el marcaje de las células se realizó añadiendo la solución de DiI a la placa de cultivo, tras haber retirado el medio RPMI. Posteriormente se procedió a la incubación de las células durante 5 minutos a 37°C, para a continuación hacerlo durante 14 minutos a 4°C, tras lo cual se realizó el lavado de la solución de trabajo y la preparación de las células para su utilización según la técnica convencional.

El exceso de células que necesitó ser preservado para su utilización posterior fue almacenado en una dilución de DMSO en cámaras de nitrógeno líquido a -80°C.



**Figura 6:** Análisis citométrico de una de las muestras celulares empleada para seleccionar la concentración adecuada de DiI. En este caso se muestra el marcaje con una concentración de DiI de 5  $\mu$ M. En la gráfica de la derecha se muestra el porcentaje de células marcadas positivamente con DiI y en la de la izquierda la población total de células. M1: Células no marcadas con DiI. M2: Células marcadas con DiI.

## Tejido nervioso acelular

El tejido nervioso periférico necesario para los injertos nerviosos heterólogos fue obtenido mediante un procedimiento quirúrgico de 8 animales hembra de entre 8 y 10 semanas de edad, a las que se les realizó la extracción de segmentos de 1.5 centímetro de nervios mixtos. Se resecaron bilateralmente los nervios axilar, musculocutáneo, cubital, mediano y torácico largo, seleccionando los que presentaban un calibre similar. El método de eutanasia empleado fue mediante asfixia en una cámara de CO<sub>2</sub> con regulador de suministro de gases, a una velocidad de llenado del 20% por minuto, de acuerdo con los protocolos de eutanasia establecidos en la normativa vigente.

Para el proceso de descelularización se empleó la técnica de Sondell<sup>70</sup>. Previamente a la selección del protocolo de descelularización que iba a ser aplicado, se realizó un ensayo piloto empleando variaciones en las concentraciones de detergente y en los tiempos de inmersión para seleccionar el protocolo que consiguiera eliminar el mayor porcentaje de células, preservando la arquitectura del nervio. El análisis de los resultados se realizó mediante cortes histológicos de microscopía electrónica (Figura 7).

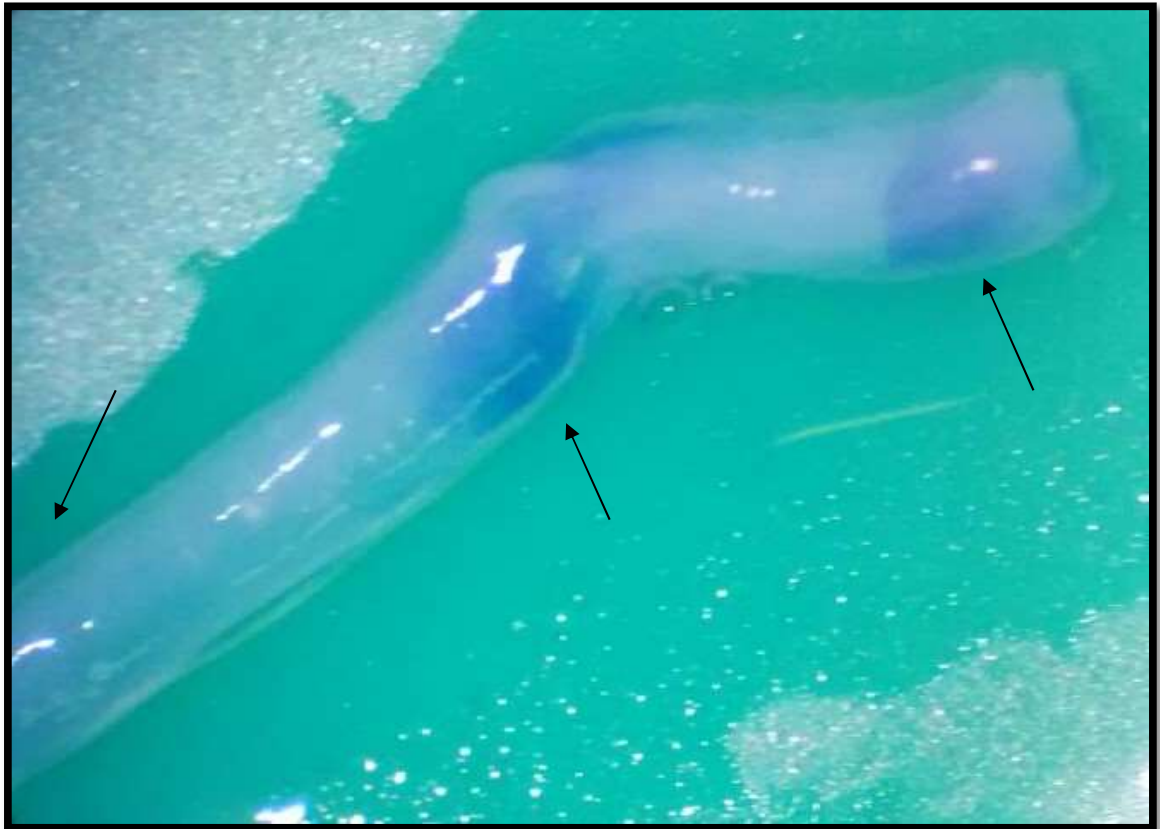
Brevemente, para llevar a cabo la descelularización, los fragmentos nervioso obtenidos fueron lavados en agua destilada a temperatura ambiente durante 2 horas. Seguidamente se realizó su inmersión durante 12 horas en el detergente Tritón X-100 (Thermo Fisher, Madrid, ES) al 3% en agua destilada. En un tercer paso se procedió a la inmersión durante 24 horas de los segmentos nerviosos en sodium deoxycholate (Thermo Fisher, Madrid, ES) al 4% en agua destilada. Al finalizar este periodo se realizaron tres lavados durante 15 minutos cada uno en solución tamponada de sodio 50 mM y fosfato 10mM (Thermo Fisher, Madrid, ES). El almacenamiento se llevó a cabo en solución

tamponada a 4°C. Todo el proceso fue realizado a temperatura ambiente, con agitación constante a 160 rpm. Parte de los nervios descelularizados en el procedimiento anteriormente descrito fueron empleados como vehículo para el cultivo de células troncales mesenquimales procedentes de médula ósea.



**Figura 7:** Imagen de microscopía electrónica (magnificación 4000x), donde se muestra la imagen del nervio tras el proceso de descelularización. Se puede ver la ausencia de células y la preservación de la arquitectura del tejido.

El proceso de inserción de las células madre en el interior de nervio descelularizado fue realizado en el interior de una cabina de flujo laminar, con ayuda de un microscopio, previamente a la implantación del tejido nervioso en el animal de experimentación. Fueron implantadas  $3 \times 10^5$  células a nivel subepineural por cada injerto a través de pequeñas perforaciones epineurales. Para el procedimiento se requirió de la utilización de una pinza de relojero recta y una micropipeta (Stripper®, Origio, Dinamarca) de 135  $\mu\text{m}$  de grosos (Figura 8).



**Figura 8:** Imagen obtenida a través del microscopio quirúrgico del tejido nervioso descelularizado tras haber sido realizada la siembra de células troncales mesenquimales marcadas con DiI. Las flechas marcan las áreas azules correspondientes a los puntos de inserción.



## Procedimiento quirúrgico

Los 42 animales del protocolo quirúrgico fueron divididos en tres grupos de manera aleatoria; 12 ratas en el grupo control, 12 ratas en el grupo experimental A y 18 ratas en el grupo experimental B. A todos los ejemplares se les practicó el mismo procedimiento quirúrgico con el fin de producir una lesión selectiva de las raíces C5 y C6 del plexo braquial en la extremidad anterior derecha, seguido de una transferencia del nervio frénico ipsilateral al nervio musculocutáneo asociada a la interposición de un injerto nervioso. En el grupo control se empleó un injerto nervioso autólogo obtenido del nervio axilar derecho, distal a la lesión, en el grupo experimental A fue interpuesto un injerto acelular heterólogo y en el grupo experimental B un injerto acelular heterólogo como vehículo para un cultivo de células troncales mesenquimales provenientes de médula ósea marcadas mediante sondas fluorescentes lipofílicas rojas DiI.

En primer lugar se procedió a realizar la inducción anestésica por inhalación. Se introdujo al animal en una cámara de inducción conectada a un sistema que permitía la entrada de gases y se administró sevoflurano a un flujo del 5% y oxígeno a 1,5 L/min. Tras la inducción, el animal se trasladó a la tabla quirúrgica donde fue colocado en decúbito dorsal sobre una superficie que permitía la regulación térmica y evitaba la pérdida de calor, fijándose de manera no invasiva con un fragmento de esparadrapo, cada una de las extremidades y la cola, evitando la hiperextensión de las extremidades anteriores para no entorpecer la mecánica respiratoria. Se introdujo la parte distal de la cabeza en un cono conectado a un sistema de gases por el que se administró sevoflurano al 3% y oxígeno a 1,5 L/min. Se comprobó la profundidad anestésica ejerciendo una ligera presión en la cola o en las almohadillas plantares posteriores. Es en este momento se procedió a la administración de la analgesia preoperatoria con buprenorfina a dosis de

0,01 - 0,05 mg/kg por vía subcutánea, administrada con una aguja de 25 G a nivel abdominal (Figura 9).



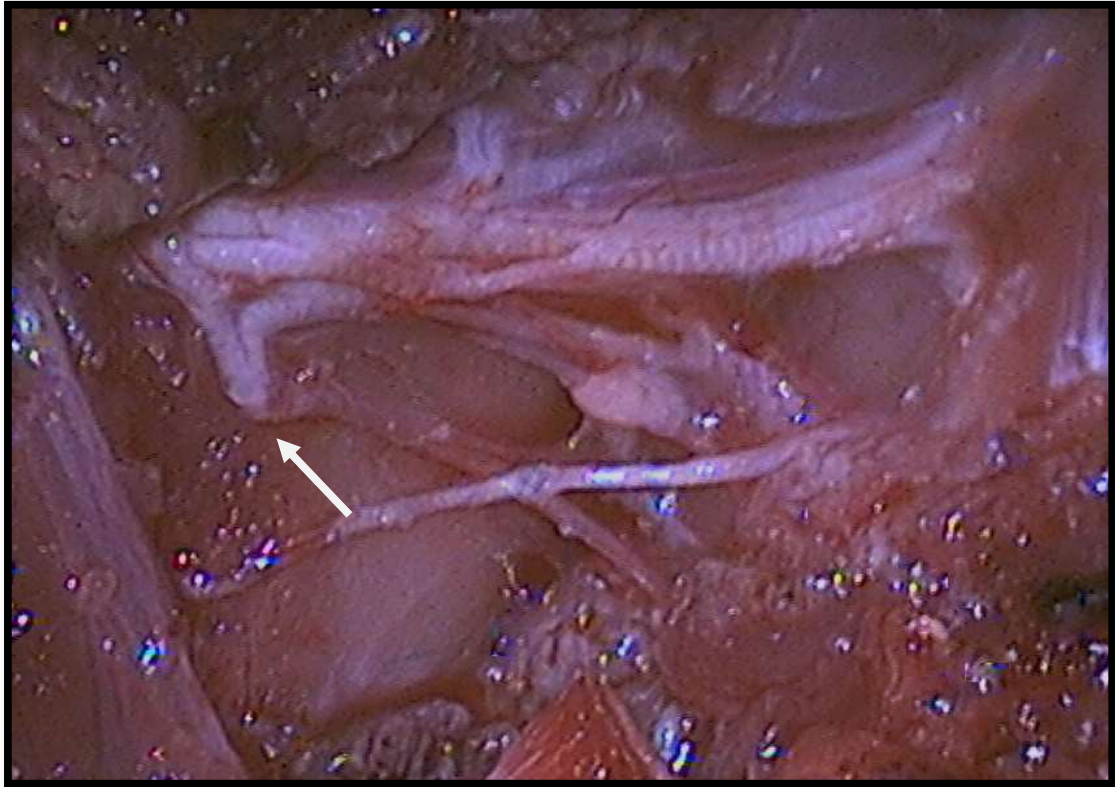
**Figura 9:** Posición quirúrgica del animal tras ser anestesiado. Nótese la orientación del animal, que tiene la porción más cefálica próxima al cirujano, lo que facilita la correcta visualización de las estructuras nerviosas.

La preparación del campo quirúrgico se llevó a cabo mediante el rasurado de la región cervical anterior, la desinfección con solución alcohólica de clorhexidina y la posterior colocación de un campo quirúrgico con paños estériles, lo que permitió realizar todo el procedimiento de manera aséptica.

Cada animal fue asignado a uno de los grupos (Control, Experimental A o Experimental B) de manera aleatoria y fue marcado mediante perforaciones en la oreja antes de iniciar la intervención quirúrgica para identificar a cuál de los grupos pertenecía.

Se realizó una incisión en L a nivel de la línea media cervical hasta la horquilla esternal que se prolongó siguiendo el reborde clavicular hacia el miembro anterior derecho, permitiendo un abordaje adecuado de plexo braquial. Para lograr la exposición de las raíces nerviosas C5 y C6 se realizó una disección roma previamente a la sección del músculo escaleno anterior, del músculo esternohioideo y de la musculatura subclavia. Este abordaje nos permitió acceder a su vez a las raíces C7, C8 y T1. A continuación se procedió a la disección lateral del plexo braquial con el objetivo de identificar el origen del nervio musculocutáneo, que se localizó entre los músculos coracobraquial y la porción corta del bíceps braquial. Posteriormente, fue necesaria la disección del nervio frénico ipsilateral hasta su entrada en la cavidad torácica, nivel al que se realizó la sección del mismo.

La lesión de las raíces nerviosas C5 y C6 se realizó a nivel del foramen intervertebral mediante la sección y exéresis de un segmento nervioso de tres milímetros de ambas raíces para conseguir producir una lesión selectiva del plexo braquial del tronco superior (Figura 10).



**Figura 10:** Imagen intraoperatoria tomada a través del microscopio quirúrgico del plexo braquial tras la sección del tronco superior. La flecha muestra los muñones distales.

La técnica de reparación empleada consistió en la transferencia de axones desde el nervio frénico a la porción distal del nervio musculocutáneo. Para completar el espacio entre el cabo proximal del nervio frénico y el cabo distal del nervio musculocutáneo y poder realizar una sutura nerviosa libre de tensión, fue necesario interponer un injerto de 0.5 cm, que variaría en función del grupo al que pertenezca cada animal. La sutura del injerto se realizó con el mismo en posición retrógrada, para reducir la dispersión axonal, mediante dos puntos simples de nylon 10/0 en cada uno de los extremos bajo visión a través de un microscopio quirúrgico.

- **Grupo Control**

En el grupo Control se empleó como injerto, tejido nervioso autólogo mixto, obtenido del nervio axilar, distal a la lesión del tronco superior.

- **Grupo Experimental A**

En los animales asignados al grupo Experimental A el injerto nervioso fue realizado mediante la interposición de tejido nervioso alogénico acelular.

- **Grupo Experimental B**

Los animales del grupo Experimental B se injertaron empleando la interposición de tejido nervioso alogénico acelular como soporte para un cultivo de células troncales mesenquimales de rata provenientes de médula ósea macadas mediante colorante DiI.

Las suturas microquirúrgicas realizadas se llevaron a cabo con un microscopio Optomic OP-C12 con objetivo de 16x y aumentos 200, 250, 300 y 400 mm, dotado de un sistema de iluminación de luz fría de 150 w, cámara y pantalla incorporada y se empleó un hilo monofilamento no reabsorbible de 10/0 con aguja cilíndrica no espatulada.

Una vez finalizado el procedimiento, se procedió a la hemostasia con pinza bipolar y al cierre por planos con sutura trenzada reabsorbible con aguja triangular de 5/0.

## Postoperatorio

Durante el postoperatorio se realizó un protocolo de evaluación diario que incluyó el control del peso y de la conducta del animal, el grado de cicatrización de la herida y el riesgo de infección, durante al menos la primera semana. Al no presentarse ninguna complicación se espaciaron las evaluaciones a un control semanal hasta el momento de la eutanasia. El protocolo de evaluación se especifica con más detalle en el apartado de punto final humanitario.

Como analgesia postoperatoria se empleó Buprenorfina a dosis de 0,01 - 0,05 mg/kg por vía subcutánea durante las primeras 48 horas, asociada a una pauta de Ibuprofeno por vía oral diluido en el agua de bebida a una concentración de 20 mg/ml durante una semana.

Los animales fueron trasladados a un alojamiento individual en una habitación separada del resto, con una temperatura algo más elevada, de en torno a los 25 °C. Se les aumentó el espesor del lecho y la frecuencia de cambiado. La administración de antibióticos no fue necesaria puesto que no se detectaron casos de infección. En caso de haber sido necesario se hubiera administrado amoxicilina por vía subcutánea cada doce horas a dosis de 150 mg/kg.

## Recogida de datos

Tras la cirugía, todos los animales fueron evaluados de manera diaria para obtener datos clínicos del proceso de reinervación. Se registró la aparición de contracciones involuntarias del músculo bíceps contra gravedad. Estas contracciones se producían de manera sincrónica con la respiración y eran sencillas de identificar cuando el animal se posaba sobre sus patas traseras.

A las 12 semanas después de la primera intervención se realizó un segundo procedimiento quirúrgico. La finalidad de este segundo procedimiento al que fueron sometidos cada uno de los animales fue la obtención de datos objetivos que permitieran evaluar el grado de reinervación del musculo a estudio.

Cada uno de los animales fue sometido a un procedimiento quirúrgico bajo anestesia general de idénticas características al empleado en la primera intervención. La incisión se realizó siguiendo la cicatriz de la cirugía previa, mediante un abordaje cutáneo en L a nivel de la línea media cervical hasta la horquilla esternal, que se prolongó siguiendo el reborde clavicular hacia el miembro anterior derecho. Debido a la cirugía previa, fue necesario realizar una disección y exéresis de parte del tejido fibrótico-cicatricial que se había formado, hasta identificar y liberar de las posibles adherencias el nervio frénico, el segmento de injerto nervioso y el nervio musculocutáneo (Figuras 11 y 12). Los puntos de sutura empleados en la neurorrafia facilitaron en gran medida esta localización. Se realizó en un segundo lugar la exposición del músculo bíceps.

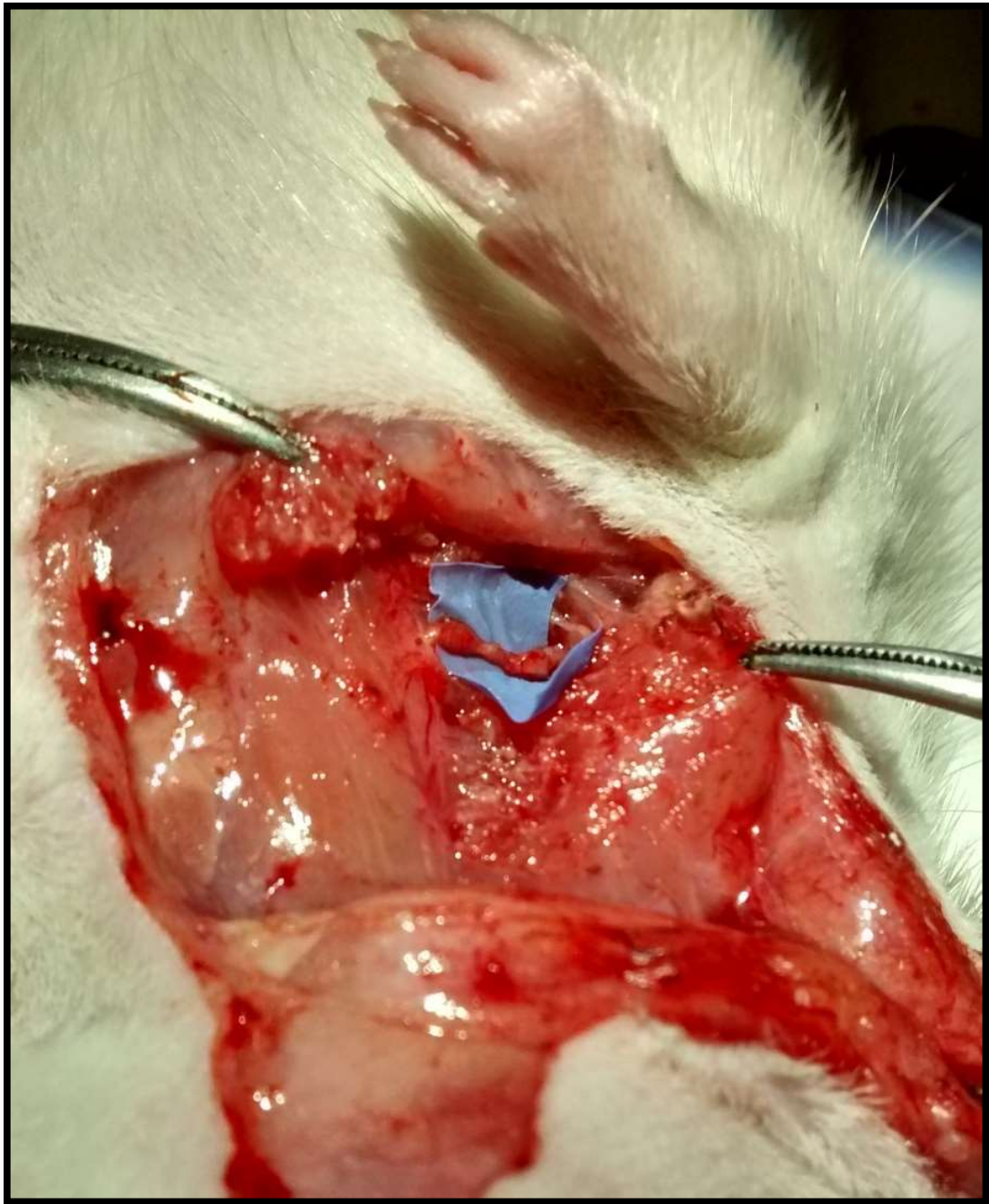


Figura 11: Imagen intraoperatoria del segundo tiempo quirúrgico donde se muestra el injerto nervioso disecado sobre un fondo de contraste azul.



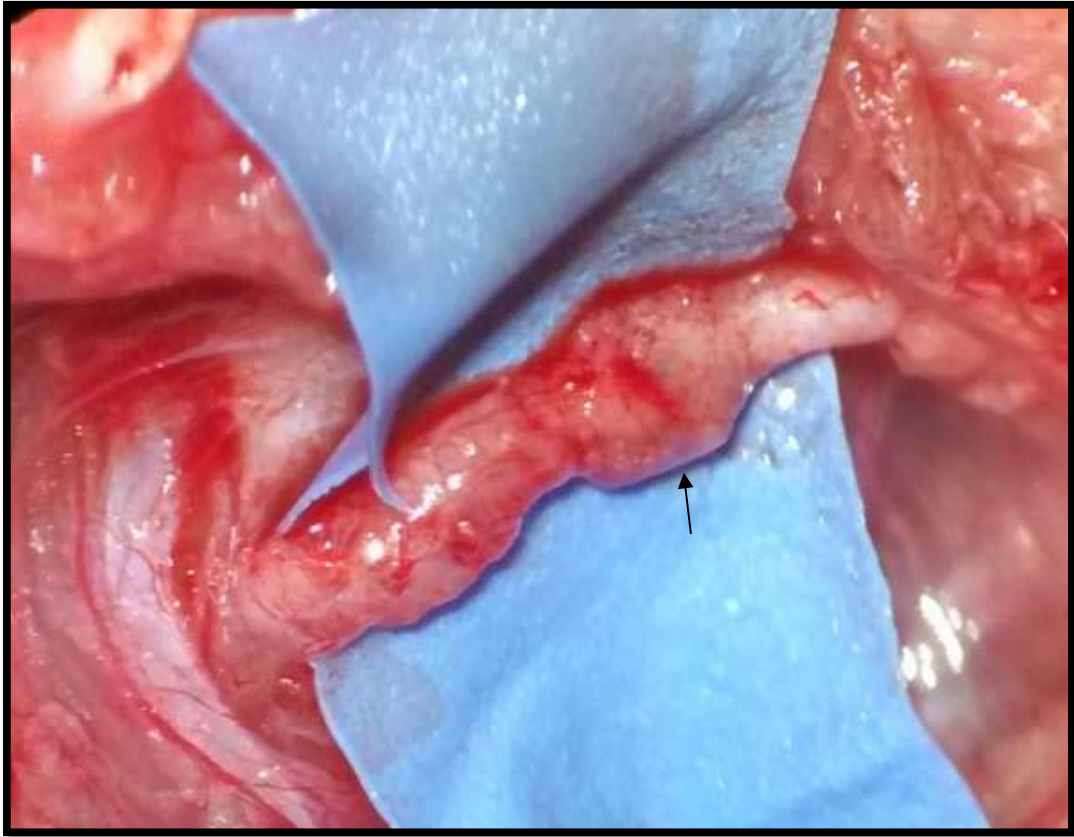


Figura 12: Imagen intraoperatoria a través de microscopio quirúrgico del injerto de nervio a las 12 semanas de su implantación. Nótese el importante tejido cicatricial que lo rodea (flecha).

- **Registro electrofisiológico**

Una vez expuesto el campo, se colocó un material de contraste en la parte posterior del nervio frénico para facilitar la realización de la electroneurografía y tratar de aislar el tejido nervioso de la musculatura subyacente.

Para realizar la electroneurografía se colocó el electrodo de estimulación sobre el nervio frénico cuidando que tanto el ánodo como el cátodo se encontrasen en contacto únicamente con el tejido nervioso. Se empleó para el registro un electrodo monopolar,

que se posicionó en contacto con el nervio musculocutáneo, manteniendo una distancia constante de un centímetro con el electrodo de estimulación. Con la misma disposición del animal se realizó el registro electromiográfico, manteniendo en la misma posición el electrodo de estimulación y trasladando el de registro al músculo bíceps, posicionándolo a 1,5 cms. Para mantener la posición y distancia de los electrodos se empleó un aparato de estereotaxis. La toma de tierra se colocó en el tejido celular subcutáneo.

El objetivo del registro fue medir en la electroneurografía la amplitud del potencial de acción nervioso (PAN) y su latencia, y en la electromiografía la amplitud del potencial de acción motor compuesto (CMAP) y su latencia, para lo que se empleó un amplificador (AM Systems, Jaen, Spain) asociado a una interfaz Power 1401 (Cambridge Electronic Design Limited, Cambridge, United Kingdom). El procesamiento de los datos se realizó con el programa Spike 2 (Centre d'Estudis Demogràfics, Barcelona, Spain) (Figura 13).

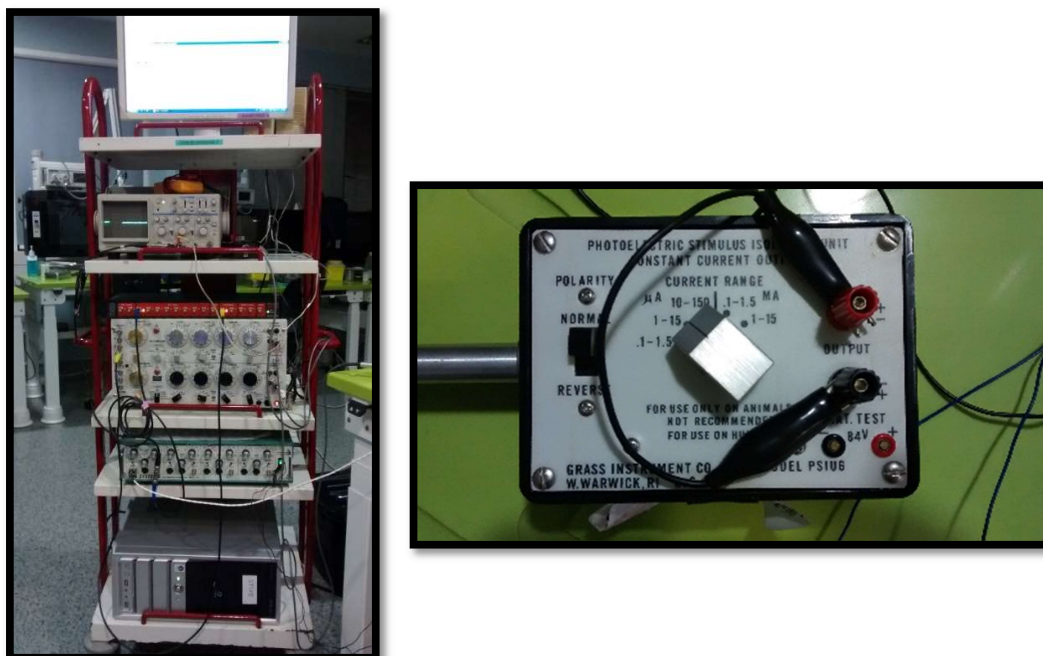


Figura 13: En la imagen de la izquierda se muestra el sistema empleado para el registro electrofisiológico, y en la imagen de la derecha el amplificador asociado a interfaz Power 1401.

- **Recogida de muestras anatomopatológicas**

Una vez finalizado el registros electrofisiológico, se procedió a la recogida de muestras para su estudio anatomopatológico diferido. Las piezas fueron procesadas para su estudio mediante microscopía óptica y microscopía electrónica.

- **Análisis histológico**

Los músculos bíceps de todos los animales, así como la porción proximal de los injertos nerviosos, fueron fijados en formaldehído (Thermo Fisher, Madrid, ES) al 10% durante 24 horas, para su posterior deshidratación en alcohol gradiente (Thermo Fisher, Madrid, ES) y su inclusión en parafina. Se realizaron cortes con microtomo de 4µm, tras lo que se procedió a la desparafinización a 60º con xileno (Thermo Fisher, Madrid, ES) y su rehidratación mediante inmersión en alcohol de 100º, alcohol de 96º y agua. Se realizó la tinción con hematoxilina de Harris (Thermo Fisher, Madrid, ES) durante 5 minutos, seguido de un aclarado con agua y la posterior aplicación de eosina (Thermo Fisher, Madrid, ES) durante 1 minuto. Se finalizó con la deshidratados en alcohol de 96º, alcohol de 100º y la inmersión en xileno, permitiendo su estudio bajo microscopía óptica. Se empleó un microscopio óptico (Olympus).

La mitad proximal del injerto nervioso de los animales pertenecientes al grupo B se procesó mediante una técnica de congelación, con el objetivo de realizar el estudio de fluorescencia de las CTMs marcadas durante la fase prequirúrgica del estudio. Para esta técnica se emplearon placas con fijador OCT (Thermo Fisher, Madrid, ES) que se introdujeron tras la colocación del segmento nervioso en posición vertical en una solución de isopentano (C5H12) (Thermo Fisher, Madrid, ES) al 100% previamente enfriada en

nitrógeno líquido, para lograr una congelación rápida. Las muestras fueron transportadas en hielo seco a un congelador para su almacenado a  $-80^{\circ}\text{C}$  hasta su procesado.

Para el análisis de inmunofluorescencia se realizaron cortes de  $4\mu\text{m}$  con un criostato. Se realizó la permeabilización de la muestra con Tritón (Thermo Fisher, Madrid, ES) al 0.1% en PBS durante 10 minutos a temperatura ambiente, tras lo que se realizó un lavado con PBS durante 5 minutos. Por último se cubrió con  $100\ \mu\text{L}$  medio de montaje Vectashield (Thermo Fisher, Madrid, ES) con DAPI (4',6-diamidino-2-fenilindol) (Thermo Fisher, Madrid, ES) para su análisis con un microscopio fluorescente convencional (Olympus).

- **Microscopía electrónica**

Fue procesado para su estudio mediante microscopía electrónica un segmento de 2,5 mm de la porción distal del injerto nervioso. Se realizó la fijación de las muestras con una disolución en PBS de glutaraldehído (Thermo Fisher, Madrid, ES) al 1.5%, paraformaldehído (Thermo Fisher, Madrid, ES) al 1.5% y ácido tánico (Thermo Fisher, Madrid, ES) al 0.1% durante 12 horas a  $4^{\circ}\text{C}$ , seguido de una postfijación en tetróxido de osmio (Thermo Fisher, Madrid, ES) al 1%, deshidratación en acetona en gradiente (Thermo Fisher, Madrid, ES) y finalmente inclusión en una resina epoxi de baja viscosidad SPURR (Thermo Fisher, Madrid, ES). Se realizaron cortes de 60 nm con un ultramicrotomo, que fueron teñidos con azul de toluidina (Thermo Fisher, Madrid, ES). Los parámetros analizados fueron el área y el grosor de la capa de mielina, el área y el diámetro de las fibras nerviosas y el porcentaje de fibras mielínicas, para lo que se empleó un software de análisis (Soft Imaging System GmbH, Olympus, Shinjuku, Japón). Los parámetros analizados se cuantificaron en dos cortes aleatorios de cada muestra, con una magnificación  $\times 2000$ , empleando un microscopio electrónico de transmisión JEM 1010

(Jeol, Akishima, Japón). El patólogo fue ciego para el grupo del estudio al que pertenecía cada muestra. La toma de imágenes se realizó con una cámara digital (Mega View III).

- **Análisis estadístico**

Fue empleado para el análisis estadístico el software SPSS 22.0 (IBM Inc, Armonk, New York). Se realizó un análisis descriptivo de todas las variables incluidas en el estudio, que fueron expresadas en términos de media  $\pm$  SD (desviación estándar) y mediana. Para el análisis se empleó la prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis para muestras independientes, utilizando la corrección para comparaciones múltiples. Se consideró estadísticamente significativa una  $P < 0.05$ .

## **Eutanasia**

Una vez finalizado el proceso de recogida de muestras se procedió a la eutanasia del animal mediante la administración por punción intracardiaca con una aguja de 23G de 1 mL de una solución de cloruro potásico, confirmándose posteriormente la muerte del animal, todo ello con arreglo a la normativa EU D 63/2010.

## Aspectos éticos

Todo el proyecto de investigación se diseñó con arreglo a la normativa vigente para el manejo de animales de experimentación EU D 637/2010 y fue revisado y aprobado por el comité de ética animal y el órgano competente (CEEA: 2015/R02, 07/01/2015). El proyecto se clasificó de acuerdo al RD 53/2013 como tipo III y el nivel de severidad fue severo (Anexo B).

### **Punto final humanitario. Modo de aplicación**

Para el correcto desarrollo del proyecto se elaboró un protocolo para llevar a cabo el punto final humanitario en caso de ser necesario basado en la normativa vigente. Se especificó que cada uno de los animales debía ser evaluado de manera diaria durante los primeros siete días, para posteriormente pasar a ser evaluado semanalmente hasta el momento de la eutanasia si no eran detectadas complicaciones. Se realizó la evaluación de cinco parámetros que puntuaban del uno al cinco, siendo uno la ausencia de signos objetivables y cinco la aparición de clínica severa, con excepción de la pérdida de peso, que se puntuó teniendo en cuenta el porcentaje de peso perdido por el animal desde el momento de la cirugía.

Parámetros evaluados:

- Pérdida de peso:
  - 1 punto: pérdida < 10%
  - 2 puntos: pérdida de entre el 10 y el 15%

- 3 puntos: pérdida de entre el 15 y el 20%
- 4 puntos: pérdida de entre el 20 y el 25 %
- 5 puntos: pérdida > 25%
- Alteración del aspecto o letargia durante un periodo de tiempo superior a tres días:
  - Disminución del acicalamiento, presencia de secreciones rojas oculares o nasales, agitación, alteraciones en la respuesta a la manipulación o vocalizaciones.
- Automutilación persistente.
- Impedimento para el consumo de agua o alimentos prolongado.
- Síntomas de posible enfermedad infecciosa:
  - 1 punto: ausencia de signos
  - 2 puntos: signos leves
  - 3 puntos: signos moderados
  - 4 puntos: signos graves
  - 5 puntos: no hay respuesta a la antibioterapia a las 48 horas

Se estableció su aplicación cuando el sumatorio de la evaluación de la severidad global alcanzase una puntuación de 15 o superior, o si alguno de los parámetros individualmente alcanzaba la puntuación máxima.

La aplicación del punto final humanitario se llevaría a cabo mediante eutanasia por exposición CO<sub>2</sub> en una cámara con regulador de suministro de gases, a una velocidad de llenado del 20% por minuto. Los animales debían ser mantenidos en la cámara tras 3 minutos después de que se evidencia la ausencia de signos vitales. El procedimiento debía ser realizado con arreglo a la normativa vigente EU D 63/2010.

## Resultados

Para el protocolo quirúrgico fueron empleados 42 animales macho, de un peso medio de  $335.13 \pm 35,71$  gramos y  $80 \pm 10$  días de vida, con una distribución homogénea entre los grupos.

Todos los animales mostraron datos de reinervación clínica entre la tercera y cuarta semana de postoperatorio, consistente en flexión del codo involuntaria de manera sincrónica con la respiración, siendo la aparición de la contracción de media a los  $20.69 \pm 2,14$  días en el grupo control, a los  $21.08 \pm 2,61$  días en el grupo experimenta A y a los  $21.28 \pm 2,49$  días en el grupo experimental B. Las diferencias observadas en el tiempo de aparición de los primeros datos de contracción no fueron estadísticamente significativas entre los grupos.

El test del acicalamiento no pudo ser empleado para monitorizar la recuperación motora porque ninguno de los animales logró el control voluntario de la flexión del codo debido al uso del nervio frénico como donante.



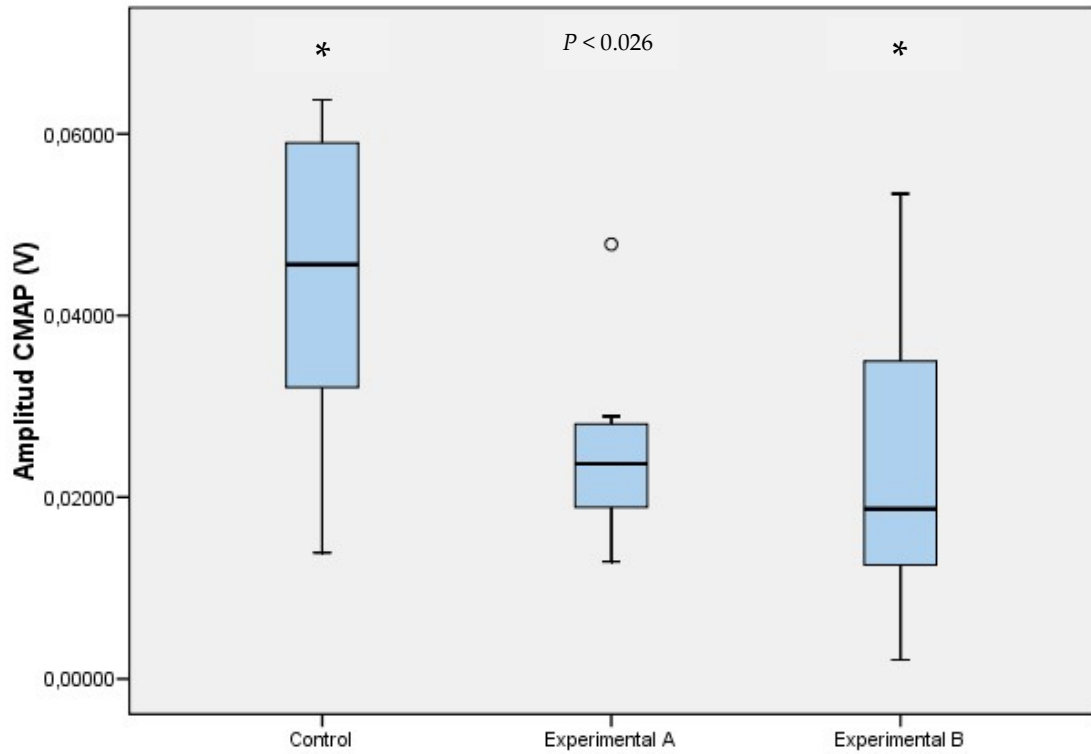
## Registro electrofisiológico

Se observaron diferencias estadísticamente significativas en los datos obtenidos de los registros electromiográficos ( $P < 0.05$ ), tanto en la amplitud de los potenciales de acción motores compuestos, que fueron significativamente mayores en el grupo control ( $0.04388 \pm 0,02$  voltios) en comparación con el grupo experimental B ( $0.02275 \pm 0,02$  voltios) (Figura 14) como en la latencia de los CMAP, que fueron significativamente menores en el grupo control ( $2.48 \pm 0,47$  milisegundos) en comparación con los grupos experimentales A ( $4.38 \pm 0,78$  ms) y B ( $4.08 \pm 0,85$  ms) (Figura 15), pero no entre los dos grupos experimentales ( $P > 0.05$ ). Las diferencias observadas en la amplitud de los potenciales de acción motores compuestos, a pesar de ser mayores en el grupo control, no fueron estadísticamente significativas al compararlas con el grupo experimental A.

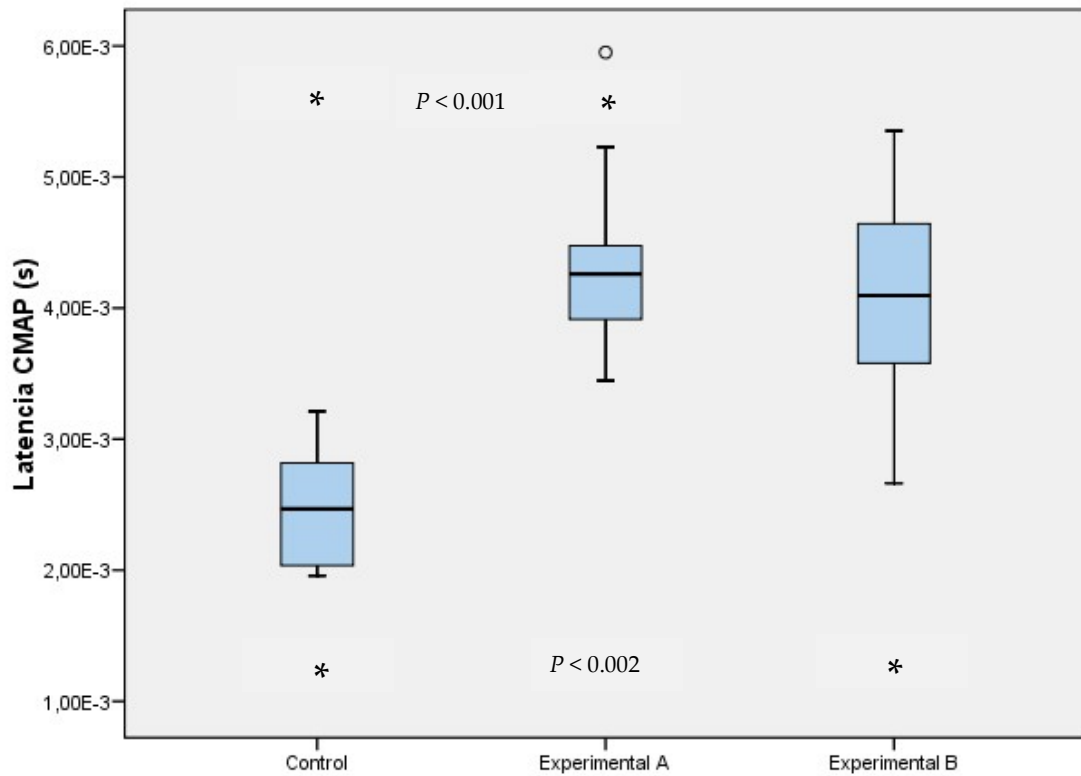
Las diferencias halladas en las electroneurográficas entre los grupos al analizar los potenciales de acción nerviosos (PAN), no fueron estadísticamente significativos al comparar los grupos experimentales con el grupo control, pero la tendencia de los datos sugiere potenciales de acción con mayor amplitud y menor latencia en el grupo experimental B al compararlo con los grupos experimental A y control. Se observaron diferencias estadísticamente significativas al comparar las latencias de los grupos experimentales entre sí, siendo menor en el grupo experimental B ( $P < 0.05$ ) (Tabla 1).

	Control			Experimental A			Experimental B			<i>P</i>
	Media	DS	Mediana	Media	DS	Mediana	Media	DS	Mediana	
<b>Amplitud CMAP(V)</b>	0.04388	0,017	0.04561	0.02525	0,011	0.02368	0.023*	0,016	0.019*	0.022
<b>Latencia CMAP (ms)</b>	2.48	0,47	2.47	4.38*	0,78	4.26*	4.08*	0,85	4.1*	0.000
<b>Amplitud PAN (V)</b>	0.00438	0,00214	0.00342	0.00442	0,00211	0.00381	0.00608	0,002	0.00614	0.096
<b>Latencia PAN (ms)</b>	2.42	1	1.98	2.30*	0,30	2.19*	1.93*	0,28	0.1.96*	0.052

**Tabla 1:** Resultados del análisis del registro electrofisiológico. Se marcan con un asterisco los datos de los grupos experimentales que mostraron diferencias estadísticamente significativas al compararlos con el grupo control, donde  $P < 0.05$ .



**Figura 14:** Gráfica de las diferencias en la amplitud de los CMAP entre los grupos experimentales y el control. A pesar de no hallar diferencias estadísticamente significativas entre ambos grupos experimentales, se puede observar una mayor variabilidad de los datos en el grupo experimental B con respecto al A. La amplitud es mayor en el grupo control con relación a los grupos experimentales, siendo esta diferencia estadísticamente significativa al compararlo con el grupo experimental B. Consideramos significación estadística una  $P < 0.05$  (\*). Los valores extremos aparecen reflejados con un círculo (°).



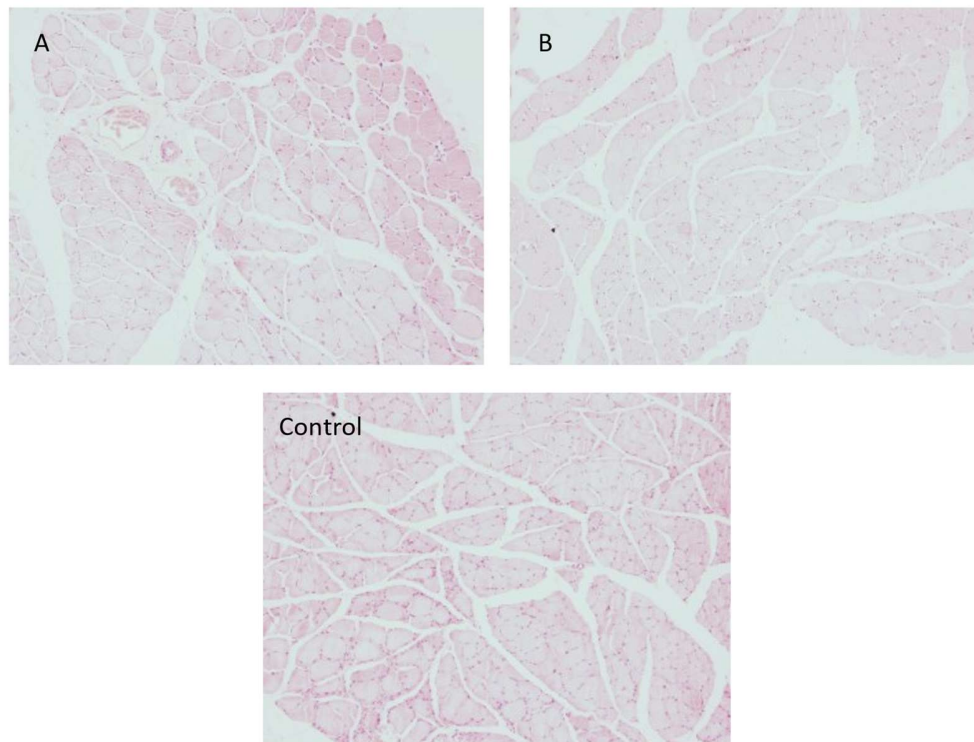
**Figura 15:** Gráfica de las diferencias en la latencia de los CMAP entre los grupos experimentales y el control. El tiempo de latencia es significativamente menor en el grupo control con respecto a los grupos experimentales (grupo A:  $P < 0.001$  y grupo B:  $P < 0.002$ ), pero no hay diferencias entre los grupos experimentales. Consideramos significación estadística una  $P < 0.05$  (\*). Los valores extremos aparecen reflejados con un círculo (°).

## **Análisis histológico**

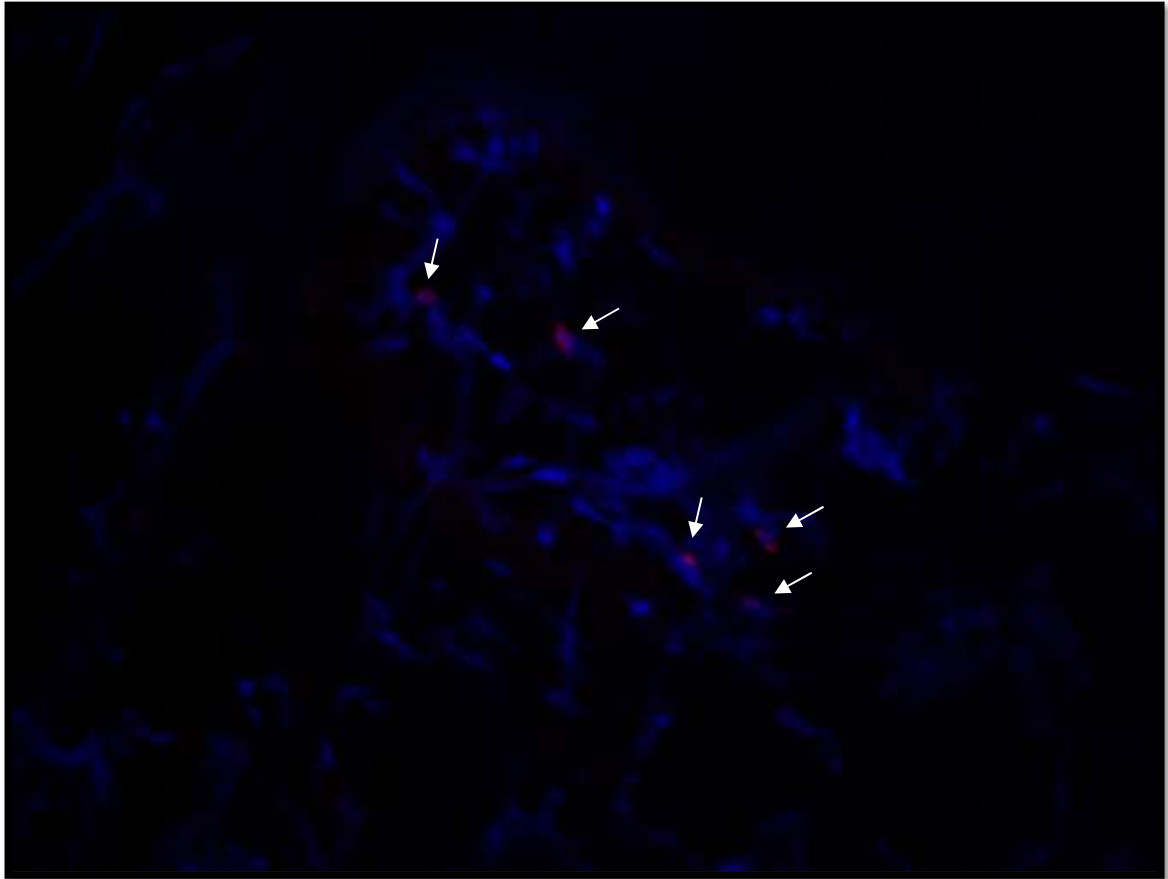
En las preparaciones de hematoxilina eosina del músculo bíceps no se observaron diferencias en la histomorfología entre los grupos, ni el tamaño de las células ni en la arquitectura del tejido (Figura 16).

En cuanto a la arquitectura nerviosa en las tinciones de hematoxilina-eosina, se observó un aumento del tejido cicatricial perineural en los grupos experimentales en relación con el grupo control, así como una menor vascularización perineural. En los tres grupos se encontró preservado el epineuro.

En el estudio de fluorescencia se observó en el grupo experimental B fluorescencia en relación a la presencia de las CTM marcadas preoperatoriamente con colorante DiI, lo que nos indicó su supervivencia en el tejido implantado (Figura 17). Además se observó una gran población celular que no era DiI positiva, lo que indica que esas células procedían de novo del receptor.



**Figura 16:** Imagen de microscopía óptica (magnificación 10x) con tinción de HE: Las imágenes corresponden a secciones del músculo bíceps de los grupos experimentales A, B y Control. Se pueden observar las similitudes en las características histomorfológicas en los tres grupos.



**Figura 17:** Imagen de microscopía óptica de fluorescencia (magnificación 20x) del segmento proximal de un injerto nervioso del grupo experimental B tras el marcaje con DAPI de los núcleos celulares (azul), donde se observan las membranas plasmáticas en rojo de las CTM marcadas con DiI (flechas blancas).

## Microscopía electrónica

El análisis de los datos obtenidos de las mediciones realizadas en los cortes de microscopía electrónica (Tabla 2) puso de manifiesto diferencias estadísticamente significativas ( $P < 0.05$ ) entre los grupos al analizar el grosor de la vaina de mielina, que fueron significativamente mayores en el grupo control ( $0.81 \pm 0,07 \mu\text{m}$ ) en comparación con los grupos experimentales A ( $0.72 \pm 0,08 \mu\text{m}$ ) y B ( $0.72 \pm 0,07 \mu\text{m}$ ) (Figura 18). También fueron halladas diferencias en el área de la vaina de mielina al comparar ambos grupos experimentales con el grupo control, siendo significativamente mayores en el grupo control ( $13.09 \pm 2,67 \mu\text{m}^2$ ) en comparación con el grupo experimental A ( $10.01 \pm 2,97 \mu\text{m}^2$ ). Las diferencias observadas en el área de la vaina de mielina, a pesar de ser mayores en el grupo control, no fueron estadísticamente significativas al compararlas con el grupo experimental B (Figura 19). No fueron halladas diferencias en ninguno de los dos parámetros medidos anteriormente entre los dos grupos experimentales (Tabla 2).

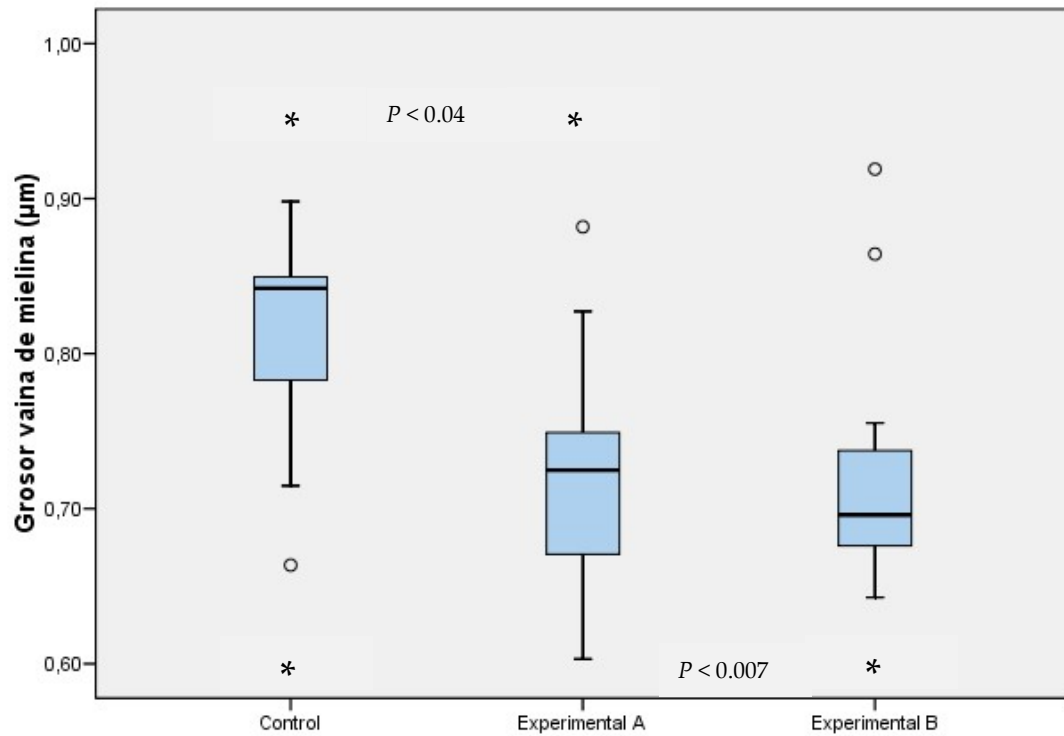
No se observaron diferencias estadísticamente significativas entre los grupos al analizar el diámetro total de las fibras y el área de las mismas. Tampoco se evidenció una diferencia porcentual en cuanto al número de fibras mielínicas y no mielínicas, pero si en el total de las mismas, siendo significativamente mayor en el grupo control, seguido del grupo experimental B ( $P < 0.05$ ).

En las imágenes de microscopía electrónica fueron fácilmente evidenciables las diferencias entre los grupos experimentales y el control, siendo lo más llamativo la mayor densidad de fibras nerviosas en el grupo control, dónde además se pudo apreciar un mayor grosor de la vaina de mielina (Figura 20).

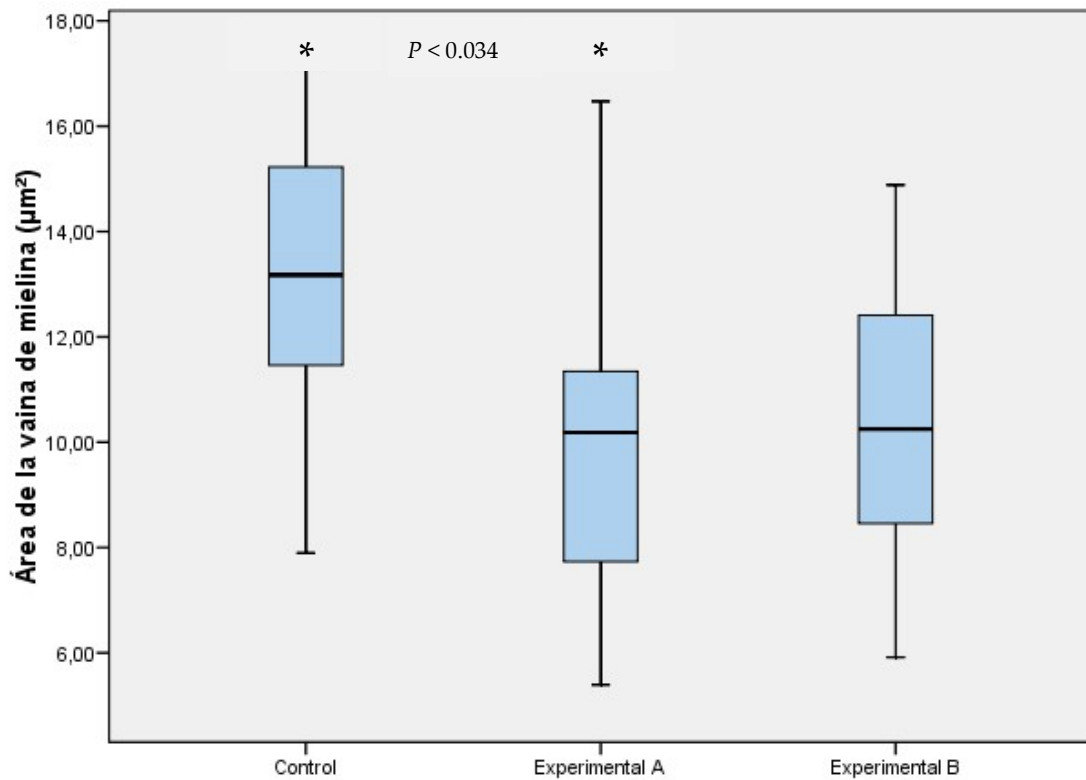


	Control			Experimental A			Experimental B			<i>P</i>
	Media	DS	Mediana	Media	DS	Mediana	Media	DS	Mediana	
<b>Grosor (<math>\mu\text{m}</math>)</b>	0.81	0,07	0.84	0.72*	0,08	0.72*	0.72*	0,07	0.70*	0.006
<b>Área de la vaina (<math>\mu\text{m}^2</math>)</b>	13.09*	2,67	13.18	10.01*	2,97	10.19*	10.44	2,61	10.25	0.023
<b>Diámetro (<math>\mu\text{m}</math>)</b>	3.19	0,46	3.24	3.15	0,91	3.26	3.66	1,23	3.29	0.81
<b>Área de la fibra (<math>\mu\text{m}^2</math>)</b>	9.42	2,58	9.51	10.37	5,56	10.37	13.24	9,22	9.29	0.843
<b>% de fibras mielínicas</b>	41.09	10,73	39.68	53.21*	12,64	55.15	45.48	10,65	43.71	0.051

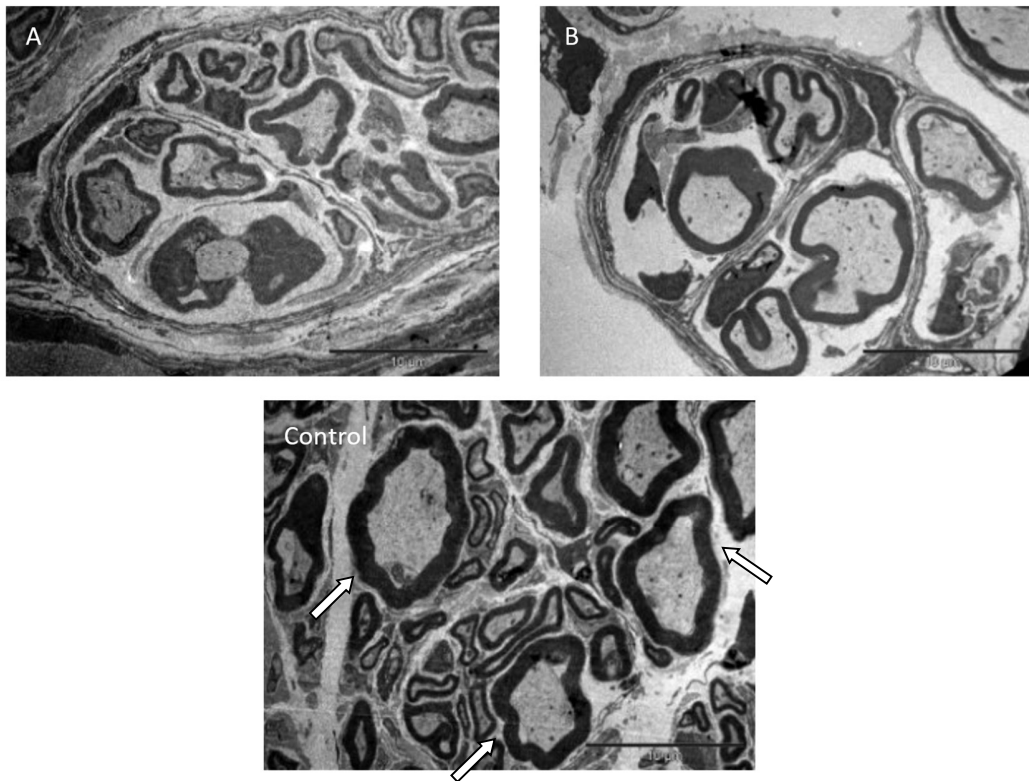
**Tabla 2:** Resultados del análisis de la microscopía electrónica. Se marcan con un asterisco los datos de los grupos experimentales que mostraron diferencias estadísticamente significativas al compararlos con el grupo control, donde  $P < 0.05$ .



**Figura 18:** La gráfica muestra las diferencias en el grosor de la vaina de mielina entre los grupos. No se hallaron diferencias estadísticamente significativas entre los grupos experimentales, pero sí de ambos con el grupo control (grupo A:  $P < 0.04$  y grupo B:  $P < 0.007$ ), siendo mayor en este último. Consideramos significación estadística una  $P < 0.05$  (\*). Los valores extremos aparecen reflejados con un círculo (°).



**Figura 19:** La gráfica muestra las diferencias en el área de la vaina de mielina entre los grupos. El grupo control presenta un área mayor que los grupos experimentales, hallándose significación estadística en esta diferencia entre el grupo control y el grupo experimental A. Consideramos significación estadística una  $P < 0.05$  (\*).



**Figura 20:** Imagen de microscopía electrónica de transmisión (magnificación 4000x) del segmento distal de los injertos nervioso. Las imágenes se corresponden por orden a los grupos A, B y control. Se puede apreciar la preservación de la membrana basal en todos los grupos, así como el mayor diámetro de la vaina de mielina en el grupo control (flechas blancas).



## Discusión

Las lesiones del plexo braquial continúan siendo una patología devastadora, cuyo tratamiento dista mucho de aportar unos resultados ideales, requiriendo en la mayoría de los casos, asumir una morbilidad añadida en las áreas donantes. La realización de este estudio pretende presentar un modelo experimental para lesiones del plexo braquial sencillo, fácilmente reproducible y que además ofrezca versatilidad para generar nuevos modelos de estudio.

Existen numerosos trabajos previos que avalan el uso del modelo murino por sus similitudes con el humano para el estudio de la patología del plexo braquial<sup>103,104</sup>. La literatura lo respalda tanto como modelo para patología congénita, como traumática<sup>17,18</sup>. Su bajo coste, la facilidad de estabulación de los animales y su sencillo manejo lo hacen óptimo para la investigación inicial y desarrollo de nuevas técnicas. Bien es cierto que existen pequeñas variaciones anatómicas en cuanto a la topografía del plexo murino si lo comparamos con el humano. La más significativa es la aportación de la raíz C7 al nervio musculocutáneo como describen Bobkiewicz et al., que a diferencia del humano solo presenta aportación de las raíces C5 y C6<sup>22</sup>. Esta aportación no interfiere en el modelo, puesto que para realizar la transferencia, aunque la lesión sea selectiva de las raíces superiores, se realiza la sección completa a nivel proximal del nervio musculocutáneo, lo que evita una posible reinervación a través de C7. A pesar de que esta aportación de C7 está descrita, Bertelli et al. demostraron que la mayor parte de las fibras del musculocutáneo que inervan el bíceps provienen de C5, y en menor medida de C4 y C6<sup>103</sup>. Para este trabajo nos decantamos por no añadir una lesión del tronco medio al modelo a

---

pesar de esta variación anatómica para evitar las posibles lesiones secundarias asociadas a las secuelas de una lesión de C7 completa, lo que dificultaría el manejo del animal y añadiría una morbilidad innecesaria en el postoperatorio.

Bertelli et al., contrariamente a lo sugerido por Greene, demostraron que el músculo bíceps solo estaba inervado por el nervio musculocutáneo y no por ramas del nervio radial, pero encontraron que un mes después de la denervación, las ratas a las que solo se les seccionó el nervio musculocutáneo tenían una puntuación más alta en la prueba de acicalamiento que las que tenía tanto el nervio musculocutáneo como la rama profunda del nervio radial seccionados<sup>103</sup>. En nuestro estudio se evaluó la presencia de flexión del codo sincrónicamente con la respiración por la acción del nervio frénico, por lo tanto, la posible interferencia de la función del nervio radial no influyó en nuestra evaluación.

Cabe destacar como limitación principal del modelo, la posibilidad de que se produzca una reinervación espontánea como describen Mackinnon et al. en un modelo de nervio ciático, donde observan reinervación espontánea tras cinco meses de una sección nerviosa con resección de un centímetro de tejido nervioso<sup>105</sup>. Es cierto que no se ha demostrado este efecto en tiempos de postoperatorio más corto, pero es un factor a tener en cuenta.

A pesar de que ya existen trabajos como los de Fang et al. orientados al tratamiento de las lesiones preganglionales abordándolas a nivel de las raíces avulsionadas, la exposición, sobre todo de las raíces altas, es todavía muy compleja y se requiere de más investigaciones al respecto<sup>15,106</sup>, por lo que el uso de transferencias nerviosas sigue siendo la opción más viable de entre las que disponemos en la actualidad. Estudios como el de Bergmeister et al. han demostrado que el uso de transferencias nerviosas puede hiperinervar los músculos diana, generando cambios neurofisiológicos sobre ellos, lo que permite una recuperación funcional en muchos casos cercana a la normal<sup>107</sup>.

Zhang et al. ya mostraron con la transferencia del nervio frénico para el nervio musculocutáneo un buen resultado en cuanto a la supervivencia de las neuronas motoras, así como de la regeneración nerviosa y de la reinervación del bíceps al compararlo con la neurorrafia directa del nervio musculocutáneo<sup>46</sup>. En este trabajo presentamos un modelo transferencia nerviosa, empleando el nervio frénico asociado a un injerto para la reinervación del músculo bíceps en una lesión selectiva del tronco superior de plexo braquial, para lo que comparamos tres variantes de tejido nervioso como injerto de interposición; tejido nervioso autólogo, tejido nervioso heterólogo acelular, tejido nervioso heterólogo acelular como soporte para la adición de células troncales mesenquimales procedentes de médula ósea. Con la salvedad del estudio de Yang et al., que presentan una modelo similar empleando C7 contralateral<sup>108</sup>, es, de acuerdo con la literatura revisada, la primera vez que se presenta un injerto nervioso acelular asociado a células troncales mesenquimales de medula ósea como puente para una transferencia de nervio frénico a musculocutáneo.

La elección del nervio frénico como donante siempre ha sido muy controvertida, por la posibilidad de generar alteraciones respiratorias. Existen estudios encaminados que describen transferencias termino-laterales para minimizar posibles secuelas y preservar la función del nervio donante<sup>109</sup>, pero por el momento no se ha evidenciado que logren un resultado equiparable al uso de la sutura termino-terminal. También es cierto que, por su origen anatómico, el nervio frénico puede verse dañado en las lesiones de tronco superior, siendo necesario en estos caso plantear el uso de otras opciones como puede ser el nervio espinal accesorio como nervio donante<sup>110</sup>.

Nos hemos basado en el trabajo de Zhang et al. para la elección del tiempo de seguimiento de 12 semanas. Al igual que ellos, evidenciamos los primeros datos de contracción muscular del bíceps de manera sincrónica con a la respiración tras la



---

reinervación entre la tercera y la cuarta semana tras la cirugía<sup>46</sup>. No se pudo emplear el test del aseo para monitorizar la recuperación motora clínica debido a que ninguno de los animales logró un control voluntario para la flexión del codo debido al uso del nervio frénico como donante.

En relación a la técnica quirúrgica, en nuestra experiencia, la posición del animal es clave para el abordaje y visualización adecuada de las raíces bajas del plexo. Optamos por una posición del animal con su porción más cefálica orientada hacia el investigador, lo que no solo nos proporcionó un más fácil acceso a las estructuras, sino que nos permitió realizar la técnica quirúrgica de manera más sencilla. A pesar de que hemos encontrado imágenes en otros trabajos como el Bobkiewicz et al. que sugieren que la posición del animal puede ser la misma que hemos empleado nosotros<sup>22</sup>, no lo hemos encontrado descrito en la literatura revisada.

De manera concordante a la literatura previa, el tejido nervioso descelularizado empleado presenta unas características óptimas que permiten la siembra de células troncales mesenquimales sin dañar su estructura, como se evidencia en las imágenes de microscopía electrónica. Presenta como ventaja al uso de otro de tipo de aloinjertos, como por ejemplo los vascularizados, en que no requiere del uso de inmunosupresión<sup>111-113</sup>. Se ha descrito en múltiples modelos en nervio ciático la superioridad del injerto descelularizado al asociarlo a factores de crecimiento como el FNTC o a fármacos como la etifoxina<sup>113,114</sup>.

La selección de las células troncales mesenquimales procedentes de médula ósea se realizó debido a su amplia disponibilidad y a la existencia de múltiples estudios en modelo animal que avalan positivamente sus resultados en el proceso de reinervación<sup>19,20</sup>. A pesar de no haber hallado diferencias estadísticamente significativas en nuestro modelo al comparar los grupos con y sin células troncales como si evidencian otros estudios como

el de Zhao et al. o el de Wang et al.<sup>16,115</sup>, sí podemos afirmar que el tejido nervioso descelularizado ha funcionado como una estructura de soporte óptimo para ellas, como proponen Tang et al.<sup>116</sup>, ya que en los estudios de fluorescencia se pudo observar su supervivencia a las 12 semanas postimplantación. Los estudios de Fan et al. muestran un efecto favorable de las células madre en cuanto a la capacidad inmunomoduladora, reduciendo los factores proinflamatorios, además de una clara superioridad de las células Schwann-like en comparación con células madre provenientes de la médula ósea<sup>14,117</sup>. Cabe destacar que en el estudio de Wang et al tampoco se hallaron diferencias estadísticamente significativas, al igual que en nuestro trabajo, entre los injertos acelulares con y sin células madre cuando se analizaba el grosor de las fibras de mielina<sup>115</sup>. Es posible que uno de los factores clave se encontrase en crear un microambiente óptimo que facilitase su diferenciación hacia células Schwann-like maximizando su capacidad potencial de plasticidad<sup>118</sup>.

En nuestro estudio observamos una vez más que los resultados obtenidos con el uso de injertos nerviosos heterólogo descelularizados distan mucho de ser los mismos que los que se logran mediante el uso de los autoinjertos, y encontramos que la adición de células troncales mesenquimales proveniente de médula ósea no aportó una mejora suficientemente significativa en los parámetros de regeneración nerviosa en este estudio. Bien es cierto que la tendencia de los datos al analizar los potenciales de acción nerviosos sugirieron mayores amplitudes y menores latencias en el grupo experimental B al compararlo con el grupo experimental A, siendo estas diferencias estadísticamente significativas al analizar las latencias. Aun no habiendo hallado otras diferencias con significación estadística entre ambos grupos experimentales, consideramos relevante el modelo, puesto que existen pocos trabajos de estas características centrados en la reparación del plexo braquial, lo que nos hace ver la necesidad de profundizar en el desarrollo de nuevas alternativas. Además, en el análisis de los injertos nerviosos descelularizados del grupo experimental B se observó una gran población celular que no

---

era DiI positiva, lo que indica que esas células procedían de novo del receptor. Se podría especular que esas células no tuvieron el tiempo suficiente para diferenciarse y favorecer una recuperación estructural y funcional del nervio superior a la que se obtendría con un injerto autólogo, aunque sí para colonizar una zona que estaba descelularizada. Un efecto similar se encontró en el trabajo de Fernandez-Pernas P. et al<sup>119</sup>. Consideramos que la posible aplicación clínica de los injertos descelularizados asociados a células troncales mesenquimales proveniente de médula ósea debería basarse en nuevos estudios experimentales que optimicen la creación de un microambiente que facilite la diferenciación celular.

## Conclusiones

1. El análisis de los resultados valida nuevamente al injerto autólogo como método de elección frente al uso de aloinjertos de nervio acelulares, empleados de manera aislada o asociado a células troncales mesenquimales provenientes de médula ósea. El injerto autólogo presenta diferencias estadísticamente significativas, mostrando mayor amplitud y menor latencia de los potenciales de acción motores compuestos, así como mayor grosor y área de la vaina de mielina frente a los grupos experimentales A y B.
2. Al comparar el uso de los injertos nerviosos descelularizados de manera aislada o asociados a las células troncales mesenquimales, no se encontraron diferencias estadísticamente significativas, a excepción de tiempos de latencia menores en el grupo asociado a células troncales mesenquimales.
3. El nuevo modelo de abordaje quirúrgico para el estudio de las lesiones de las raíces C5 y C6 del tronco superior del plexo braquial mediante la transferencia del nervio frénico al nervio musculocutáneo utilizado para este trabajo, resulta sencillo y facilita la disección para la realización del procedimiento en estudios ulteriores o para el entrenamiento microquirúrgico.



## Bibliografía

1. Zhang RC, Du WQ, Zhang JY, Yu SX, Lu FZ, Ding H-M, et al. Mesenchymal stem cell treatment for peripheral nerve injury: a narrative review. *Neural Regen Res.* 2021;16(11):2170-6.
2. Limthongthang R, Bachoura A, Songcharoen P, Osterman AL. Adult brachial plexus injury: evaluation and management. *Orthop Clin North Am.* 2013;44(4):591-603.
3. Siqueira MG, Martins RS. Surgical treatment of adult traumatic brachial plexus injuries: an overview. *Arq Neuropsiquiatr.* 2011;69(3):528-35.
4. Matthes SM, Reimers K, Janssen I, Liebsch C, Kocsis JD, Vogt PM, et al. Intravenous Transplantation of Mesenchymal Stromal Cells to Enhance Peripheral Nerve Regeneration. *BioMed Research International.* 2013;2013:e573169.
5. Millesi H. Peripheral nerve repair: terminology, questions, and facts. *J Reconstr Microsurg.* 1985;2(1):21-31.
6. Robert JS, Shin AY, Hébert-Blouin MN, Elhassan BT, Bishop AT. Traumatic Brachial Plexus Injury. En: *Green's Operative Hand Surgery.* 6th ed. Elsevier; 2011. p. 1235-92.
7. Kolar MK, Kingham PJ. Regenerative effects of adipose-tissue-derived stem cells for treatment of peripheral nerve injuries. *Biochem Soc Trans.* 2014;42(3):697-701.

8. Socolovsky M, Di Masi G, Battaglia D. Use of long autologous nerve grafts in brachial plexus reconstruction: factors that affect the outcome. *Acta Neurochir.* 2011;153(11):2231-40.
9. Hopf A, Schaefer DJ, Kalbermatten DF, Guzman R, Madduri S. Schwann Cell-Like Cells: Origin and Usability for Repair and Regeneration of the Peripheral and Central Nervous System. *Cells* [Internet]. 2020 [citado 8 de abril de 2021];9(9). Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7565191/>
10. Tung TH, Mackinnon SE. Nerve transfers: indications, techniques, and outcomes. *J Hand Surg Am.* 2010;35(2):332-41.
11. Vasudevan S, Yan JG, Zhang LL, Matloub HS, Cheng JJ. A Rat Model for Long-Gap Peripheral Nerve Reconstruction: Plastic and Reconstructive Surgery. 2013;132(4):871-6.
12. Panagopoulos GN, Megaloikonomos PD, Mavrogenis AF. The Present and Future for Peripheral Nerve Regeneration. *Orthopedics.* 2017;40(1):e141-56.
13. Saheb-Al-Zamani M, Yan Y, Farber SJ, Hunter DA, Newton P, Wood MD, et al. Limited regeneration in long acellular nerve allografts is associated with increased Schwann cell senescence. *Exp Neurol.* 2013;247:165-77.
14. Fan L, Yu Z, Li J, Dang X, Wang K. Immunoregulation effects of bone marrow-derived mesenchymal stem cells in xenogeneic acellular nerve grafts transplant. *Cell Mol Neurobiol.* 2014;34(7):999-1010.
15. Fang J, Yang J, Yang Y, Li L, Qin B, He W, et al. A novel rat model of brachial plexus injury with nerve root stumps. *Journal of Neuroscience Methods.* 2018;295:1-9.

16. Zhao Z, Wang Y, Peng J, Ren Z, Zhang L, Guo Q, et al. Improvement in nerve regeneration through a decellularized nerve graft by supplementation with bone marrow stromal cells in fibrin. *Cell Transplant*. 2014;23(1):97-110.
17. Iezzi SA, Postan D, Martínez Grillo FG. Anatomía del plexo braquial de la rata wistar como modelo experimental. *Investigación anatómica. Revista Argentina de Anatomía Online*. 2014;5(1):21-8.
18. Angélica-Almeida M, Casal D, Mafra M, Mascarenhas-Lemos L, Martins-Ferreira J, Ferraz-Oliveira M, et al. Morfologia e Vascularização do Plexo Braquial no Rato Wistar. *Acta Médica Portuguesa*. 2013;26(3):243-50.
19. Goel RK, Suri V, Suri A, Sarkar C, Mohanty S, Sharma MC, et al. Effect of bone marrow-derived mononuclear cells on nerve regeneration in the transection model of the rat sciatic nerve. *J Clin Neurosci*. 2009;16(9):1211-7.
20. Kurwale NS, Suri V, Srivastava A, Suri A, Mohanti S, Yadav P, et al. Role of bone marrow derived pluripotent stem cells in peripheral nerve repair in adult rats: A morphometric evaluation. *J Neurosci Rural Pract*. 2015;6(2):152-9.
21. Yang W, Yang J, Yu C, Gu Y. End-to-side neurotization with different donor nerves for treating brachial plexus injury: An experimental study in a rat model. *Muscle & nerve* [Internet]. 2014 [citado 29 de diciembre de 2014]; Disponible en: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/mus.24110/full>
22. Bobkiewicz A, Cwykiel J, Siemionow M. Anatomic variations of brachial and lumbosacral plexus models in different rat strains: Anatomic Variations of Brachial and Lumbosacral Plexus Models. *Microsurgery*. 2017;37(4):327-33.
23. Zhang CG, Ma JJ, Terenghi G, Mantovani C, Wiberg M. Phrenic nerve transfer in the treatment of brachial plexus avulsion: An experimental study of nerve regeneration and muscle morphology in rats. *Microsurgery*. 2004;24(3):232-40.



- 
24. Moore AM, Novak CB. Advances in nerve transfer surgery. *J Hand Ther.* 2014;27(2):96-104; quiz 105.
  25. Mackinnon SE. *Nerve Surgery.* 2015.
  26. Yi S, Zhang Y, Gu X, Huang L, Zhang K, Qian T, et al. Application of stem cells in peripheral nerve regeneration. *Burns Trauma.* 2020;8:tkaa002.
  27. Sunderland S. A classification of peripheral nerve injuries producing loss of function. *Brain.* 1951;74(4):491-516.
  28. MacKinnon SE, Dellon AL. *Surgery of the Peripheral Nerve.* New York : Stuttgart ; New York; 1988. 638 p.
  29. Rafijah G, Bowen AJ, Dolores C, Vitali R, Mozaffar T, Gupta R. The effects of adjuvant fibrin sealant on the surgical repair of segmental nerve defects in an animal model. *J Hand Surg Am.* 2013;38(5):847-55.
  30. Ray WZ, Mackinnon SE. Management of nerve gaps: autografts, allografts, nerve transfers, and end-to-side neurorrhaphy. *Exp Neurol.* 2010;223(1):77-85.
  31. Zhao Q, Dahlin LB, Kanje M, Lundborg G. Specificity of muscle reinnervation following repair of the transected sciatic nerve. A comparative study of different repair techniques in the rat. *J Hand Surg Br.* 1992;17(3):257-61.
  32. Cabaud HE, Rodkey WG, McCarroll HR, Mutz SB, Niebauer JJ. Epineurial and perineurial fascicular nerve repairs: a critical comparison. *J Hand Surg Am.* 1976;1(2):131-7.
  33. Tos P, Calcagni M, Gigo-Benato D, Boux E, Geuna S, Battiston B. Use of muscle-vein-combined Y-chambers for repair of multiple nerve lesions: Experimental results. *Microsurgery.* 2004;24(6):459-64.

- 
34. Lenoble E, Sokolow C, Ebelin M, Rigot J, Dabos N, Lemerle JP, et al. [Results of the primary repair of 28 isolated median nerve injuries in the wrist]. *Ann Chir Main.* 1989;8(4):347-51.
  35. Doi K, Tamaru K, Sakai K, Kuwata N, Kurafuji Y, Kawai S. A comparison of vascularized and conventional sural nerve grafts. *J Hand Surg Am.* 1992;17(4):670-6.
  36. Taylor GI, Ham FJ. The free vascularized nerve graft. A further experimental and clinical application of microvascular techniques. *Plast Reconstr Surg.* 1976;57(4):413-26.
  37. Matsumine H, Sasaki R, Takeuchi Y, Miyata M, Yamato M, Okano T, et al. Vascularized versus nonvascularized island median nerve grafts in the facial nerve regeneration and functional recovery of rats for facial nerve reconstruction study. *J Reconstr Microsurg.* 2014;30(2):127-36.
  38. Weber RV, Boyd KU, Mackinnon SE. Repair and Grafting of Peripheral Nerves In: *Plastic Surgery.* Edited by Neligan P, vol. 1, Third Edition. Maryland Heights, MO: Elsevier; 2011 [20] Tung TH, Mackinnon SEM. Nerve. En.
  39. Brushart TM. Preferential reinnervation of motor nerves by regenerating motor axons. *J Neurosci.* 1988;8(3):1026-31.
  40. Moradzadeh A, Borschel GH, Luciano JP, Whitlock EL, Hayashi A, Hunter DA, et al. The impact of motor and sensory nerve architecture on nerve regeneration. *Exp Neurol.* 2008;212(2):370-6.
  41. Sanapanich K, Morrison WA, Messina A. Physiologic and morphologic aspects of nerve regeneration after end-to-end or end-to-side coaptation in a rat model of brachial plexus injury. *The Journal of Hand Surgery.* 2002;27(1):133-42.

- 
42. Deng K, Zhang K, Wang S, Li X, Zhang H, Ma W. [Efficacy comparison of end-to-end and end-to-side neurorrhaphy in treatment of brachial plexus upper trunk injury]. *Zhongguo Xiu Fu Chong Jian Wai Ke Za Zhi*. 2010;24(11):1302-5.
  43. Farber SJ, Glaus SW, Moore AM, Hunter DA, Mackinnon SE, Johnson PJ. Supercharge Nerve Transfer to Enhance Motor Recovery: A Laboratory Study. *The Journal of Hand Surgery*. 2013;38(3):466-77.
  44. Kale SS, Glaus SW, Yee A, Nicoson MC, Hunter DA, Mackinnon SE, et al. Reverse End-to-Side Nerve Transfer: From Animal Model to Clinical Use. *The Journal of Hand Surgery*. 2011;36(10):1631-1639.e2.
  45. Swanson AN, Wolfe SW, Khazzam M, Feinberg J, Ehteshami J, Doty S. Comparison of Neurotization Versus Nerve Repair in an Animal Model of Chronically Denervated Muscle. *The Journal of Hand Surgery*. 2008;33(7):1093-9.
  46. Zhang CG, Ma JJ, Terenghi G, Mantovani C, Wiberg M. Phrenic nerve transfer in the treatment of brachial plexus avulsion: an experimental study of nerve regeneration and muscle morphology in rats. *Microsurgery*. 2004;24(3):232-40.
  47. Wang L, Jiang Y, Lao J, Zhao X. Contralateral C7 transfer to lower trunk via the prespinal route in the repair of brachial plexus injury: An experimental study in rats. *Journal of Plastic, Reconstructive & Aesthetic Surgery*. 2014;67(9):1282-7.
  48. Lin H, Sheng J, Hou C. The Effectiveness of Contralateral C7 Nerve Root Transfer for the Repair of Avulsed C7 Nerve Root in Total Brachial Plexus Injury: An Experimental Study in Rats. *Journal of Reconstructive Microsurgery*. 2013;29(05):325-30.
  49. Song J, Chen L, Gu Y. Functional compensative mechanism of upper limb with root avulsion of C(5)-C(6) of brachial plexus after ipsilateral C(7) transfer. *Chin J Traumatol*. 2008;11(4):232-8.

- 
50. Stephenson JB, Li R, Yan JG, Hyde J, Matloub H. Transhemispheric Cortical Plasticity Following Contralateral C7 Nerve Transfer: A Rat Functional Magnetic Resonance Imaging Survival Study. *The Journal of Hand Surgery*. 2013;38(3):478-87.
  51. Wang M, Li ZY, Xu WD, Hua XY, Xu JG, Gu YD. Sensory restoration in cortical level after a contralateral C7 nerve transfer to an injured arm in rats. *Neurosurgery*. 2010;67(1):136-43; discussion 143.
  52. Zhang CG, Terenghi G, Mantovani C, Wiberg M. Neuronal survival, regeneration and musclemorphology after posterior C7 nerve transfer: an experimental study. *J Plast Reconstr Aesthet Surg*. 2006;59(7):717-25.
  53. Zhang CG, Gu YD. Contralateral C7 nerve transfer-Our experiences over past 25 years. *Journal of brachial plexus and peripheral nerve injury*. 2011;6(1):10.
  54. Song J, Chen L, Gu Y. Effect of ipsilateral C7 nerve root transfer on restoration of rat upper trunk muscle and nerve function after brachial plexus root avulsion. *Orthopedics*. 2010;33(12):886.
  55. Ishida Y, Sakakibara S, Terashi H, Hashikawa K, Yamaoka T. Development of a novel method for decellularizing a nerve graft using a hypertonic sodium chloride solution. *Int J Artif Organs*. 2014;37(11):854-60.
  56. Karabekmez FE, Duymaz A, Moran SL. Early clinical outcomes with the use of decellularized nerve allograft for repair of sensory defects within the hand. *Hand (N Y)*. 2009;4(3):245-9.
  57. Sinis N, Kraus A, Drakotos D, Doser M, Schlosshauer B, Müller H-W, et al. Bioartificial reconstruction of peripheral nerves using the rat median nerve model. *Ann Anat*. 2011;193(4):341-6.

- 
58. Gu X, Ding F, Yang Y, Liu J. Construction of tissue engineered nerve grafts and their application in peripheral nerve regeneration. *Prog Neurobiol.* 2011;93(2):204-30.
  59. Gu X, Ding F, Williams DF. Neural tissue engineering options for peripheral nerve regeneration. *Biomaterials.* 2014;35(24):6143-56.
  60. Takagi T, Kimura Y, Shibata S, Saito H, Ishii K, Okano HJ, et al. Sustained bFGF-Release Tubes for Peripheral Nerve Regeneration: Comparison with Autograft. *Plastic and Reconstructive Surgery.* 2012;130(4):866-76.
  61. Fesli A, Sari A, Yilmaz N, Comelekoglu U, Tasdelen B. Enhancement of nerve healing with the combined use of amniotic membrane and granulocyte-colony-stimulating factor. *Journal of Plastic, Reconstructive & Aesthetic Surgery.* 2014;67(6):837-43.
  62. Moimas S, Novati F, Ronchi G, Zacchigna S, Fregnan F, Zentilin L, et al. Effect of vascular endothelial growth factor gene therapy on post-traumatic peripheral nerve regeneration and denervation-related muscle atrophy. *Gene Ther.* 2013;20(10):1014-21.
  63. Casañas J, Torre J de la, Soler F, García F, Rodellar C, Pumarola M, et al. Peripheral nerve regeneration after experimental section in ovine radial and tibial nerves using synthetic nerve grafts, including expanded bone marrow mesenchymal cells: morphological and neurophysiological results. *Injury.* 2014;45:S2-6.
  64. Mackinnon SE, Doolabh VB, Novak CB, Trulock EP. Clinical outcome following nerve allograft transplantation. *Plast Reconstr Surg.* 2001;107(6):1419-29.
  65. Whitlock EL, Tuffaha SH, Luciano JP, Yan Y, Hunter DA, Magill CK, et al. Processed allografts and type I collagen conduits for repair of peripheral nerve gaps. *Muscle Nerve.* 2009;39(6):787-99.

- 
66. Gao S, Zheng Y, Cai Q, Yao W, Wang J, Zhang P, et al. Comparison of morphology and biocompatibility of acellular nerve scaffolds processed by different chemical methods. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*. 2014;25(5):1283-91.
  67. Johnson PC, Duhamel RC, Meezan E, Brendel K. Preparation of cell-free extracellular matrix from human peripheral nerve. *Muscle Nerve*. 1982;5(4):335-44.
  68. Hudson TW, Zawko S, Deister C, Lundy S, Hu CY, Lee K, et al. Optimized Acellular Nerve Graft Is Immunologically Tolerated and Supports Regeneration. *Tissue Engineering*. 2004;10(11-12):1641-51.
  69. Hudson TW, Liu SY, Schmidt CE. Engineering an improved acellular nerve graft via optimized chemical processing. *Tissue Eng*. 2004;10(9-10):1346-58.
  70. Sondell M, Lundborg G, Kanje M. Regeneration of the rat sciatic nerve into allografts made acellular through chemical extraction. *Brain research*. 1998;795(1):44-54.
  71. Nagao RJ, Lundy S, Khaing ZZ, Schmidt CE. Functional characterization of optimized acellular peripheral nerve graft in a rat sciatic nerve injury model. *Neurol Res*. 2011;33(6):600-8.
  72. Moore AM, Ray WZ, Chenard KE, Tung T, Mackinnon SE. Nerve allotransplantation as it pertains to composite tissue transplantation. *Hand (N Y)*. 2009;4(3):239-44.
  73. He B, Zhu Q, Chai Y, Ding X, Tang J, Gu L, et al. Safety and efficacy evaluation of a human acellular nerve graft as a digital nerve scaffold: a prospective, multicentre controlled clinical trial. *J Tissue Eng Regen Med*. 2015;9(3):286-95.
  74. Brown JM, Yee A, Mackinnon SE. Distal median to ulnar nerve transfers to restore ulnar motor and sensory function within the hand: technical nuances. *Neurosurgery*. 2009;65(5):966-77; discussion 977-978.

- 
75. Zhang Y, Luo H, Zhang Z, Lu Y, Huang X, Yang L, et al. A nerve graft constructed with xenogeneic acellular nerve matrix and autologous adipose-derived mesenchymal stem cells. *Biomaterials*. 2010;31(20):5312-24.
  76. Jesuraj NJ, Santosa KB, Macewan MR, Moore AM, Kasukurthi R, Ray WZ, et al. Schwann cells seeded in acellular nerve grafts improve functional recovery. *Muscle Nerve*. 2014;49(2):267-76.
  77. Trentin JJ. Hemopoietic Microenvironments. En: Tavassoli M, editor. *Handbook of the Hemopoietic Microenvironment* [Internet]. Totowa, NJ: Humana Press; 1989 [citado 8 de abril de 2021]. p. 1-86. (Contemporary Biomedicine). Disponible en: [https://doi.org/10.1007/978-1-4612-4494-3\\_1](https://doi.org/10.1007/978-1-4612-4494-3_1)
  78. Friedenstein AJ, Chailakhjan RK, Lalykina KS. The development of fibroblast colonies in monolayer cultures of guinea-pig bone marrow and spleen cells. *Cell Tissue Kinet*. 1970;3(4):393-403.
  79. Charbord P. Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells: Historical Overview and Concepts. *Human Gene Therapy*. 2010;21(9):1045-56.
  80. Ding DC, Shyu WC, Lin SZ. Mesenchymal stem cells. *Cell Transplant*. 2011;20(1):5-14.
  81. Loeffler M, Potten C. 1 - Stem cells and cellular pedigrees – a conceptual introduction. En: Potten CS, editor. *Stem Cells*. Academic Press; 1997. p. 1-27.
  82. Loeffler M, Roeder I. Tissue stem cells: definition, plasticity, heterogeneity, self-organization and models - a conceptual approach. *Cells Tissues Organs*. 2002;171(1):8-26.
  83. Thakkar UG, Vanikar AV, Trivedi HL. Co-infusion of autologous adipose tissue derived neuronal differentiated mesenchymal stem cells and bone marrow derived

- hematopoietic stem cells, a viable therapy for post-traumatic brachial plexus injury: a case report. *Biomed J.* 2014;37(4):237-40.
84. Hur JW, Cho TH, Park DH, Lee JB, Park JY, Chung YG. Intrathecal transplantation of autologous adipose-derived mesenchymal stem cells for treating spinal cord injury: A human trial. *J Spinal Cord Med.* 2016;39(6):655-64.
85. Jessen KR, Mirsky R. The repair Schwann cell and its function in regenerating nerves. *J Physiol.* 2016;594(13):3521-31.
86. Sulaiman W, Dreesen TD. Effect of local application of transforming growth factor- $\beta$  at the nerve repair site following chronic axotomy and denervation on the expression of regeneration-associated genes. Laboratory investigation. *J Neurosurg.* 2014;121(4):859-74.
87. Haninec P, Kaiser R, Dubový P. A Comparison of Collateral Sprouting of Sensory and Motor Axons after End-to-Side Neurorrhaphy with and without the Perineurial Window: *Plastic and Reconstructive Surgery.* 2012;130(3):609-14.
88. Dubový P, Raška O, Klusáková I, Stejskal L, Čelakovský P, Haninec P. Ciliary neurotrophic factor promotes motor reinnervation of the musculocutaneous nerve in an experimental model of end-to-side neurorrhaphy. *BMC neuroscience.* 2011;12(1):58.
89. Schaakxs D, Kalbermatten DF, Raffoul W, Wiberg M, Kingham PJ. Regenerative cell injection in denervated muscle reduces atrophy and enhances recovery following nerve repair. *Muscle Nerve.* 2013;47(5):691-701.
90. Pajenda G, Pajer K, Márton G, Hegyi P, Redl H, Nógrádi A. Rescue of injured motoneurons by grafted neuroectodermal stem cells: effect of the location of graft. *Restor Neurol Neurosci.* 2013;31(3):263-74.



- 
91. Jonsson S, Wiberg R, McGrath AM, Novikov LN, Wiberg M, Novikova LN, et al. Effect of delayed peripheral nerve repair on nerve regeneration, Schwann cell function and target muscle recovery. *PLoS ONE*. 2013;8(2):e56484.
  92. Lavorato A, Raimondo S, Boido M, Muratori L, Durante G, Cofano F, et al. Mesenchymal Stem Cell Treatment Perspectives in Peripheral Nerve Regeneration: Systematic Review. *International Journal of Molecular Sciences*. 2021;22(2):572.
  93. Sayad-Fathi S, Nasiri E, Zaminy A. Advances in stem cell treatment for sciatic nerve injury. *Expert Opin Biol Ther*. 2019;19(4):301-11.
  94. Sabatino MA, Santoro R, Gueven S, Jaquiere C, Wendt DJ, Martin I, et al. Cartilage graft engineering by co-culturing primary human articular chondrocytes with human bone marrow stromal cells. *J Tissue Eng Regen Med*. 2015;9(12):1394-403.
  95. Sayad Fathi S, Zaminy A. Stem cell therapy for nerve injury. *World J Stem Cells*. 2017;9(9):144-51.
  96. Arufe MC, De la Fuente A, Mateos J, Fuentes I, De Toro FJ, Blanco FJ. Analysis of the chondrogenic potential and secretome of mesenchymal stem cells derived from human umbilical cord stroma. *Stem Cells Dev*. 2011;20(7):1199-212.
  97. Bahat-Stroomza M, Barhum Y, Levy YS, Karpov O, Bulvik S, Melamed E, et al. Induction of adult human bone marrow mesenchymal stromal cells into functional astrocyte-like cells: potential for restorative treatment in Parkinson's disease. *J Mol Neurosci*. 2009;39(1-2):199-210.
  98. Wang Y, Jia H, Li WY, Tong XJ, Liu GB, Kang SW. Synergistic effects of bone mesenchymal stem cells and chondroitinase ABC on nerve regeneration after acellular nerve allograft in rats. *Cell Mol Neurobiol*. 2012;32(3):361-71.

- 
99. Sakar M, Korkusuz P, Demirbilek M, Çetinkaya DU, Arslan S, Denkbaş EB, et al. The effect of poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyhexanoate) (PHBHHx) and human mesenchymal stem cell (hMSC) on axonal regeneration in experimental sciatic nerve damage. *International Journal of Neuroscience*. 2014;124(9):685-96.
  100. Hu N, Wu H, Xue C, Gong Y, Wu J, Xiao Z, et al. Long-term outcome of the repair of 50 mm long median nerve defects in rhesus monkeys with marrow mesenchymal stem cells-containing, chitosan-based tissue engineered nerve grafts. *Biomaterials*. 2013;34(1):100-11.
  101. De la Fuente A, Mateos J, Lesende-Rodríguez I, Calamia V, Fuentes-Boquete I, de Toro FJ, et al. Proteome Analysis During Chondrocyte Differentiation in a New Chondrogenesis Model Using Human Umbilical Cord Stroma Mesenchymal Stem Cells\*. *Molecular & Cellular Proteomics*. 2012;11(2):M111.010496.
  102. Rodríguez-Lorenzo A, Arufe MC, de la Fuente A, Fernandez F, Blanco F. Influence of flap prefabrication on seeding of subcutaneously injected mesenchymal stem cells in microvascular beds in rats. *Ann Plast Surg*. 2014;73(2):234-8.
  103. Bertelli JA, Taleb M, Saadi A, Mira JC, Pecot-Dechavassine M. The rat brachial plexus and its terminal branches: An experimental model for the study of peripheral nerve regeneration. *Microsurgery*. 1995;16(2):77-85.
  104. Geuna S, Tos P, Raimondo S, Lee JM, Gambarotta G, Nicolino S, et al. Functional, morphological and biomolecular assessment of posttraumatic neuro-muscular recovery in the rat forelimb model. *Acta Neurochir Suppl*. 2007;100:173-7.
  105. Mackinnon SE, Hudson AR, Hunter DA. Histologic assessment of nerve regeneration in the rat. *Plast Reconstr Surg*. 1985;75(3):384-8.

106. Han L, Kan S, Yuan J. [Experimental study on reimplantation of ventral root into spinal cord after brachial plexus avulsion]. *Zhongguo Xiu Fu Chong Jian Wai Ke Za Zhi*. 2007;21(9):948-52.
107. Konstantin D., Aman M, Muceli S, Vujaklija I, Manzano-Szalai K, Unger E, et al. Peripheral nerve transfers change target muscle structure and function. *Sci Adv*. 2019;5(1):eaau2956.
108. Yang JT, Fang JT, Li L, Chen G, Qin BG, Gu LQ. Contralateral C7 transfer combined with acellular nerve allografts seeded with differentiated adipose stem cells for repairing upper brachial plexus injury in rats. *Neural Regen Res*. 2019;14(11):1932.
109. Jia X, Chen C, Yang J, Yu C. End-to-side neurotization with the phrenic nerve in restoring the function of toe extension: an experimental study in a rat model. *Journal of Plastic Surgery and Hand Surgery*. 2018;52(3):185-8.
110. Chuang DC, Lee GW, Hashem F, Wei FC. Restoration of shoulder abduction by nerve transfer in avulsed brachial plexus injury: evaluation of 99 patients with various nerve transfers. *Plast Reconstr Surg*. 1995;96(1):122-8.
111. Chang TNJ, Chen KT, Gorden T, Daniel BW, Hernon C, Shafarenko M, et al. Vascularized Brachial Plexus Allotransplantation—An Experimental Study in Brown Norway and Lewis Rats. 2019;103(1):11.
112. Li W, Jia Z, Zhang S, Lin X, Yang R, He Q, et al. The cellular immune mechanism after transfer of chemically extracted acellular nerve xenografts. *PLoS ONE*. 2013;8(7):e68806.
113. Zhang Y, Zhang H, Katiella K, Huang W. Chemically extracted acellular allogeneic nerve graft combined with ciliary neurotrophic factor promotes sciatic nerve repair. *Neural Regen Res*. 2014;9(14):1358-64.

- 
114. Zhou X, He B, Zhu Z, He X, Zheng C, Xu J, et al. Etifoxine provides benefits in nerve repair with acellular nerve grafts. *Muscle Nerve*. 2014;50(2):235-43.
  115. Wang Y, Zhao Z, Ren Z, Zhao B, Zhang L, Chen J, et al. Recellularized nerve allografts with differentiated mesenchymal stem cells promote peripheral nerve regeneration. *Neurosci Lett*. 2012;514(1):96-101.
  116. Tang P, Kilic A, Konopka G, Regalbuto R, Akelina Y, Gardner T. Histologic and functional outcomes of nerve defects treated with acellular allograft versus cabled autograft in a rat model. *Microsurgery*. 2013;33(6):460-7.
  117. Fan L, Yu Z, Li J, Dang X, Wang K. Schwann-like cells seeded in acellular nerve grafts improve nerve regeneration. *BMC Musculoskelet Disord*. 2014;15:165.
  118. Tohill M, Terenghi G. Stem-cell plasticity and therapy for injuries of the peripheral nervous system. *Biotechnology and applied biochemistry*. 2004;40(1):17-24.
  119. Fernandez-Pernas P, Rodríguez-Lesende I, Fuente A de la, Mateos J, Fuentes I, Toro JD, et al. CD105<sup>+</sup>-mesenchymal stem cells migrate into osteoarthritis joint: An animal model. *PLOS ONE*. 30 de noviembre de 2017;12(11):e0188072.



## **A. Anexo:**

**Artículo científico derivado del trabajo de investigación realizado para la elaboración de la tesis doctoral, publicado en la revista *Microsurgery*:**

**“Acellular nerve graft enriched with mesenchymal stem cells in the transfer of the phrenic nerve to the musculocutaneous nerve in a C5-C6 brachial plexus avulsion in a rat model”**

Anexo A: Acellular nerve graft enriched with mesenchymal stem cells in the transfer of the phrenic nerve to the musculocutaneous nerve in a C5-C6 brachial plexus avulsion in a rat model.

---



Received: 5 May 2021 | Revised: 14 August 2021 | Accepted: 17 September 2021  
DOI: 10.1002/micr.30829

RESEARCH ARTICLE

MICROSURGERY | WILEY

## Acellular nerve graft enriched with mesenchymal stem cells in the transfer of the phrenic nerve to the musculocutaneous nerve in a C5-C6 brachial plexus avulsion in a rat model

Alba González Rodríguez MD<sup>1</sup> | Sara A. González Porto MD, PhD<sup>2</sup> |  
Nerea Comellas Melero MD, PhD<sup>1</sup> | María C. Arufe PhD<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Research Group on Cell Therapy and Regenerative Medicine; Physiotherapy, Biomedical Sciences and Medicine Department, A Coruña University (CHUAC INIBIC), A Coruña, Spain

<sup>2</sup>Plastic Surgery Department, Álvaro Cunqueiro Hospital, Vigo, Spain

### Correspondence

Alba González Rodríguez, Department of Plastic and Reconstructive Surgery, A Coruña Hospital, As Xubias de Arriba 84, 15006 A Coruña, Spain.  
Email: alba.gonzalez.rodriguez@udc.es

### Funding information

Coruña University/CISUG

### Abstract

**Introduction:** Phrenic nerve transfer has been shown to achieve good nerve regeneration in brachial plexus avulsion. Acellular nerve allografts (ANAs) showed inferior results to autografts, which is why its use with mesenchymal stem cells (MSCs) is currently being studied. The aim is to study the effect of BM-MSCs associated with ANAs in a rat model of phrenic nerve transfer to the musculocutaneous nerve in a C5-C6 avulsion.

**Material and methods:** 42 Wistar-Lewis rats underwent a C5-C6 lesion in the right forelimb by excising a 3 mm segment from both roots, followed by a phrenic nerve transfer to the musculocutaneous nerve associated with the interposition of a three types of nerve graft (randomly distributed): control (autograft) group (n = 12), ANAs group (n = 12), and ANAs + BM-MSCs group (n = 18)

After 12 weeks, amplitude and latency of the NAP and the compound motor action potential (CMAP) were measured. Biceps muscles were studied by histological analysis and nerve grafts by electron microscopy and fluorescence analysis.

**Results:** Statistically significant reductions were found in latency of the CMAP between groups control (2.48 ± 0.47 ms) and experimental (ANAs: 4.38 ± 0.78 ms, ANAs + BM-MSCs: 4.08 ± 0.85 ms) and increases in the amplitude of the CMAP between groups control (0.04388 ± 0.02 V) and ANAs + BM-MSCs (0.02275 ± 0.02 V), as well as in the thickness of the myelin sheath between groups control (0.81 ± 0.07 μm) and experimental (ANAs: 0.72 ± 0.08 μm, ANAs + BM-MSCs: 0.72 ± 0.07 μm) and in the area of the myelin sheath between groups control (13.09 ± 2.67 μm<sup>2</sup>) and ANAs (10.01 ± 2.97 μm<sup>2</sup>) (p < .05). No statistically significant differences have been found between groups ANAs and ANAs + BM-MSCs.

**Conclusions:** This study presents a model for the study of lesions of the upper trunk and validates the autologous graft as the gold standard.

This is an open access article under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits use, distribution and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.  
© 2021 The Authors. *Microsurgery* published by Wiley Periodicals LLC.



## 1 | INTRODUCTION

Brachial plexus injury is a devastating chronic pathology for patients and represents a surgical challenge due to complex anatomy and lesion patterns. Selective lesions of C5 and C6 roots are extremely limiting because they affect shoulder control due to the loss of suprascapular and axillary nerves and elbow flexion, due to the loss of the musculocutaneous nerve (Limthongthang et al., 2013). These three nerves are critically important for proper upper limb function.

In cases of circumscribed nerve tissue loss, reconstruction with interposition of nerve grafts is one of the most widely used therapeutic options. However, increasing the length of required nerve grafts will determine the viability of this technique. In those cases, the prognosis for reinnervation by means of nerve grafts is very poor (Kolar & Kingham, 2014), which makes it necessary to consider distal nerve transfers (Tung & Mackinnon, 2010). Nerve transfers are the only remaining technique, especially for preganglionic injuries (Vasudevan et al., 2013).

There are several options for performing neurotization, such as the use of contralateral C7 or the spinal accessory nerve, but phrenic nerve transfer has been shown to achieve good nerve regeneration when used as a donor nerve in brachial plexus avulsion injuries, and the procedure is associated with low morbidity (Zhang et al., 2004).

It is necessary to highlight the limiting factors posed by autologous nervous tissue used as a donor for nerve grafts, due to the limited number of donor nerves available and the morbidity associated with the donor area. For this reason, there is a need to seek therapeutic alternatives to repair the nerve defect, such as the use of acellular nerve allografts (ANAs) or synthetic nerve conduits. ANAs offer several advantages over synthetic nerve conduits because they maintain their extracellular matrix and three-dimensional architecture (Karabekmez et al., 2009) and do not possess the inconvenience of immunogenicity presented by allografts. Despite this, its results are inferior to autografts, which is why their use when enriched with mesenchymal stem cells (MSCs), is being studied, in order to achieve comparable results (Zhao et al., 2014).

Interest in the use of stem cells from mesenchymal tissue has increased exponentially in recent years, with lines of research oriented in this direction becoming more and more frequent. Studies in animals, especially in the murine model, are increasingly common. Promising results have been obtained in their use, but the mechanism by which this benefit is obtained is not entirely clear (Fan et al., 2014a).

The goal of this study is to develop an experimental model of preganglionic lesions of the upper trunk and reconstruction based on a transfer from the phrenic nerve to the musculocutaneous nerve. Three different types of nerve grafts will be examined.

## 2 | MATERIAL AND METHODS

### 2.1 | Mesenchymal stem cells preparation

Cells were obtained from the long bones of the hind limbs (femur and tibia) of 12 14-day-old female Wistar-Lewis rats. The process was

carried out under sterile conditions in laminar flow cabinets. The extraction of the bone marrow was carried out by means of flushing techniques with Roswell Park Memorial Institute (RPMI) medium with 10% fetal bovine serum and 1% penicillin and streptomycin antibiotic solution. Once the sample was obtained, it was cultured in the same medium on cell culture plates according to the usual protocols, using 0.25% trypsin to carry out cell passages and phosphate saline solution (PBS). The incubation was carried out in ovens at 37°C.

When the MSCs reached 80% confluence in P2, they were labeled with indocarbocyanine fluorescent lipophilic cationic dye (DiI). A stock solution of DiI in dimethylsulfoxide (DMSO) at a concentration of 2 mg/ml was used to obtain a dilution of DiI at 0.1 µM in Hank's balanced salt solution (HBSS) from Gibco™ (ThermoFisher, Madrid, SP). The optimal concentration used was based on the results obtained from the cytometric analysis of different cell samples previously labeled with different concentrations of solution, where a labeling of at least 90% of the cells analyzed was considered adequate. Briefly, the labeling of the cells was carried out by adding the DiI solution to the culture plate, after having removed the RPMI medium. Subsequently, the cells were incubated for 5 min at 37°C followed by 14 min at 4°C, after which the working solution was washed and the cells were prepared according to the conventional technique.

### 2.2 | Acellular nerve tissue preparation

The peripheral nerve tissue was obtained by means of a surgical procedure in eight female animals between 8 and 10 weeks old. We extracted 1.5 cm segments of mixed nerves from terminal branches of the brachial plexus. The axillary, musculocutaneous, ulnar, median, and long thoracic nerves were resected. For the decellularization process, the protocol published by Sondell et al. was used (Sondell et al., 1998). Eighteen of the decellularized nerves were cultured with BM-MSCs. The process of inserting the stem cells into the nerve was carried out inside a laminar flow cabinet, prior to the implantation of the nervous tissue within the experimental animal.  $3 \times 10^5$  cells per graft were inserted sub-epineurally through small epineural perforations. This procedure required the use of a micropipette (Stripper® Tip, 135 µm, Origio, Denmark).

### 2.3 | Model establishment and experimental design

The experimental design was carried out with 62 rats (Wistar-Lewis [LEW] haplotype RT11 LEW/HanHsd line). The femurs of 12 14-day-old female rats were used to obtain the stem cells and eight 10-week-old female rats were used as nervous tissue donors. The protocol was evaluated and approved by the ethics committee for animal experimentation (CEEA: 2015/R02, 07/01/2015).

The surgical procedure was carried out with 42 male rats with a mean weight of  $335.13 \pm 35.71$  grams and  $80 \pm 10$  days old that were divided randomly into three groups; 12 rats in the control group,

12 rats in the ANAs group and 18 rats in the ANAs + BM-MSCs group. All the animals underwent the same surgical procedure in order to produce a lesion of the C5 and C6 roots in the right forelimb, followed by an ipsilateral phrenic nerve transfer to the musculocutaneous nerve, completed with the interposition of a nerve graft.

Inhalation anesthetic induction was performed in an induction chamber with 5% sevoflurane and 1.5 L/min oxygen and was maintained with 2% sevoflurane and 1.5 L/min oxygen. Preoperative analgesia with 0.05 mg/kg buprenorphine was administered subcutaneously.

An L-shaped incision was made at the level of the cervical midline up to the sternal fork, and prolonged following the clavicular ridge toward the right forelimb. To achieve exposure of the roots, a dissection of the anterior scalene muscle, the sternohyoid muscle, and the subclavian musculature was performed. The lateral brachial plexus dissection was carried out in order to identify the origin of the musculocutaneous nerve, which is located between the coracobrachialis muscles and the short portion of the biceps brachii, since the latter will be used as a receptor for nerve transfer (Figure 1). Subsequently, it was necessary to dissect the ipsilateral phrenic nerve down to the point where it enters the thoracic cavity, where it was sectioned. Injury to the C5 and C6 nerve roots was performed at the level of the intervertebral foramen by sectioning and excising a 3 mm nerve segment from both roots.

The repair technique consisted of the transfer of axons from the phrenic nerve to the distal portion of the musculocutaneous nerve via a 0.5 cm graft by end-to-end technique. In the control group we used an autologous nerve graft harvested from a segment of axillary nerve, distal to the lesion, in ANAs group we interposed a heterologous acellular graft and in ANAs + BM-MSCs group a heterologous acellular graft enriched with BM-MSCs, labeled with the vital dye DiI. The graft was sutured in a retrograde position using two simple epineural 10/0

nylon stitches at each end, viewed through an Optomic OP-C12 surgical microscope with  $\times 16$  lens and 200, 250, 300, and 400 mm magnification, with a 150w cold light illumination system.

The follow-up time was 12 weeks, during which a daily clinical evaluation was carried out to assess the appearance of muscle contraction in the biceps. After that time, an electrophysiological record was performed to measure the amplitude and latency of the nerve action potential (NAP) and the compound motor action potential (CMAP). The distal portion of the nerve graft was processed for study by electron microscopy, the biceps muscle by histological analysis and proximal half of the nerve graft (ANAs + BM-MSCs group) by fluorescence analysis.

## 2.4 | Electrophysiological examination

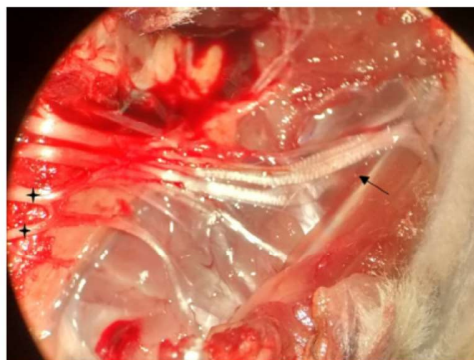
The electrophysiological record was carried out at 12 weeks of follow-up under general anesthesia after exposing the phrenic nerves, the nerve graft segment and the musculocutaneous nerve, as well as the biceps muscle. The stimulation electrode was placed on the phrenic nerve and a monopolar electrode was used for recording, located in contact with the musculocutaneous nerve, maintaining a constant distance of 1 cm from the stimulation electrode with a stereotaxis apparatus. With the animal in the same position, the electromyographic recording was carried out, transferring the recording electrode to the biceps muscle, placing it at 1.5 cm.

The aim was to measure the amplitude and latency of the NAP and the CMAP, for which an amplifier (AM Systems, Jaen, Spain) associated with a Power 1401 interface (Cambridge Electronic Design Limited, Cambridge, United Kingdom) was used. The data were processed with the Spike 2 program (Center d'Estudis Demogràfics, Barcelona, Spain).

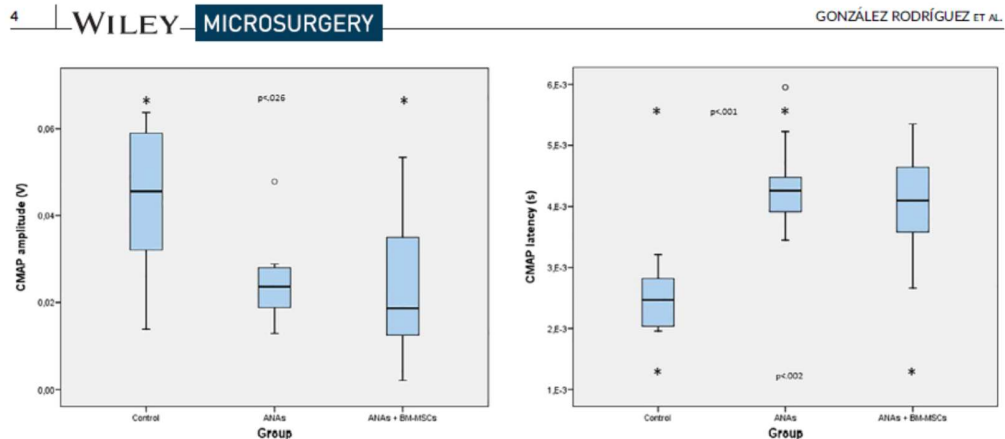
## 2.5 | Histological analysis

The biceps muscle of all the animals were fixed in 10% formaldehyde for 24 h, followed by subsequent dehydration in gradient alcohol and inclusion in paraffin. Four-micrometer microtome cuts were made, after which deparaffinization was carried out at 60°C with xylene and its rehydration by immersion in 100° alcohol, 96° alcohol and water. Harris hematoxylin staining was performed for 5 min, followed by a water rinse and subsequent application of eosin for 1 min. It was completed with dehydration in 96° alcohol, 100° alcohol, and immersion in xylene, allowing its study under light microscopy (Olympus).

The proximal half of the nerve graft from the animals belonging to ANAs + BM-MSCs group was processed using a freezing technique. Plates with O.C.T fixative were introduced after placing the nerve segment in a vertical position in a 100% isopentane (C5H12) solution previously cooled in liquid nitrogen, to achieve rapid freezing. The samples were transported on dry ice to a freezer for storage at -80°C until processing. For the immunofluorescence analysis, the sample was permeabilized with 0.1% Triton in PBS for 10 min at room



**FIGURE 1** Intraoperative image taken through the surgical microscope. Note the orientation of the animal, which has the most cephalic portion close to the surgeon. C6-C5 roots are indicated with asterisks and musculocutaneous nerve with a star



**FIGURE 2** Differences in the amplitude and latency of CMAP. Despite not finding statistically significant differences between both experimental groups, amplitude is significantly greater in the control group and latency time is less in the control group. Outliers are represented as circles. \* $p < .05$ . CMAP, compound motor action potential

**TABLE 1** Statistical analysis of the electrophysiological findings. No statistically significant differences have been found between groups ANAs and ANAs + BM-MSCs in the amplitude and the latency of CMAPs. \* $p < .05$  statistically significant

	Amplitude (V) mean $\pm$ SD	Comparison with control	Latency (ms) mean $\pm$ SD	Comparison with control
Control	0.04388 $\pm$ 0.02		2.48 $\pm$ 0.47	
ANAs	0.02525 $\pm$ 0.01	$p = .093$	4.38 $\pm$ 0.78	* $p = .001$
ANAs + BM-MSCs	0.02275 $\pm$ 0.02	* $p = .026$	4.08 $\pm$ 0.85	* $p = .002$

Abbreviations: ANAs, acellular nerve allografts; MSCs, mesenchymal stem cells.

temperature, after which a PBS wash was performed for 5 min. Finally, Vectashield mounting medium with DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole) was covered with 100  $\mu$ l for analysis with a conventional fluorescent microscope (Olympus).

## 2.6 | Electron microscopy

The distal portion of the nerve graft was processed for study by electron microscopy. The samples were fixed with a PBS solution of 1.5% glutaraldehyde, 1.5% paraformaldehyde, and 0.1% thamic acid for 12 h at 4°C, followed by a post fixation in 1% osmium tetroxide, dehydration in acetone in gradient and finally inclusion in a low-viscosity epoxy resin SPURR. Sixty-nanometer sections were made with an ultramicrotome, which were stained with toluidine blue.

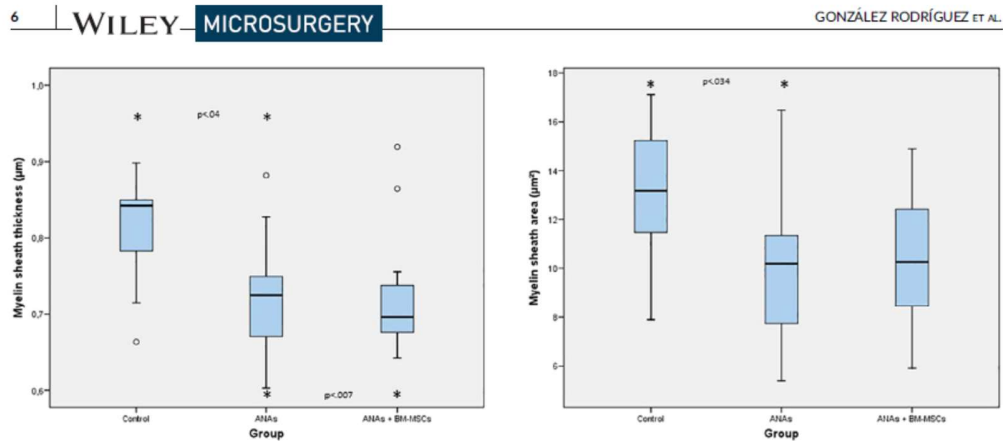
The parameters analyzed were the area and thickness of the myelin layer, the area and diameter of the nerve fibers and the percentage of myelin fibers, for which an analysis software (Soft Imaging System GmbH, Olympus, Shinjuku, Japan) was used. They were quantified in two random sections of each sample, with a magnification  $\times 2000$ , using a JEM 1010 transmission electron microscope (Jeol, Akishima, Japan). Images were taken with a Mega View III digital camera.

## 2.7 | Statistical analysis

SPSS 24.0 software (IBM Inc, Armonk, New York) was used for the statistical analysis. A descriptive analysis was carried out of all the variables included in the study, which were expressed in terms of mean  $\pm$  SD. The acquired data were not normally distributed, therefore we have used the nonparametric Kruskal-Wallis test for independent samples, using the correction for multiple comparisons. We have considered  $p < .05$  statistically significant.

## 3 | RESULTS

For the surgical protocol, 42 male rats were used. All animals showed clinical reinnervation consisting of involuntary flexion of the elbow synchronously with respiration between the third and fourth postoperative week, this being in the control group at 20.69  $\pm$  2.14 days of average, in the ANAs group at 21.08  $\pm$  2.61 days and in the ANAs + BM-MSCs group at 21.28  $\pm$  2.49 days. No differences were observed in the time of appearance of the first contraction data between the groups. The grooming test could not be used to monitor clinical motor recovery because none of the animals achieved voluntary control for elbow flexion due to the use of the phrenic nerve as a donor.



**FIGURE 5** Differences in the thickness and the area of the myelin sheath between the groups. No statistically significant differences were found between the experimental groups, but there were differences in the thickness between both and the control group. The control group presents a larger area than the experimental groups, finding statistical significance in this difference with ANAs group. Outliers are represented as circles. \* $p < .05$ . ANAs, acellular nerve allografts

**TABLE 2** Statistical analysis of the electronic microscopy findings. No statistically significant differences have been found between groups ANAs and ANAs + BM-MSCs in the thickness and the area of the myelin sheath. \* $p < .05$  statistically significant

	Amplitude (V) mean $\pm$ SD	Comparison with control	Latency (ms) mean $\pm$ SD	Comparison with control
Control	0.81 $\pm$ 0.07		13.09 $\pm$ 2.67	
ANAs	0.72 $\pm$ 0.08	* $p = .04$	10.01 $\pm$ 2.97	* $p = .034$
ANAs + BM-MSCs	0.72 $\pm$ 0.07	* $p = .007$	10.44 $\pm$ 2.61	$p = .068$

Abbreviations: ANAs, acellular nerve allografts; MSCs, mesenchymal stem cells.

neither in the size of the cells nor the architecture of the tissue (Figure 3).

Fluorescence was observed in ANAs + BM-MSCs group in relation to the presence of MSCs preoperatively marked with Dil dye, which indicates their survival in the implanted tissue (Figure 4).

### 3.3 | Electron microscopy findings

The data analysis revealed a statistically significant difference between the groups when analyzing the thickness of the myelin sheath of the fibers, which was significantly greater in the control group (0.81  $\pm$  0.07  $\mu\text{m}$ ) compared with ANAs group (0.72  $\pm$  0.08  $\mu\text{m}$ ,  $p = .04$ ) and ANAs + BM-MSCs group (0.72  $\pm$  0.07  $\mu\text{m}$ ,  $p = .007$ ), and the area of the myelin sheath, which was significantly greater in control group (13.09  $\pm$  2.67  $\mu\text{m}^2$ ) compared with ANAs group (10.01  $\pm$  2.97  $\mu\text{m}^2$ ,  $p = .034$ ) (Figure 5), but not between the two experimental groups (Table 2).

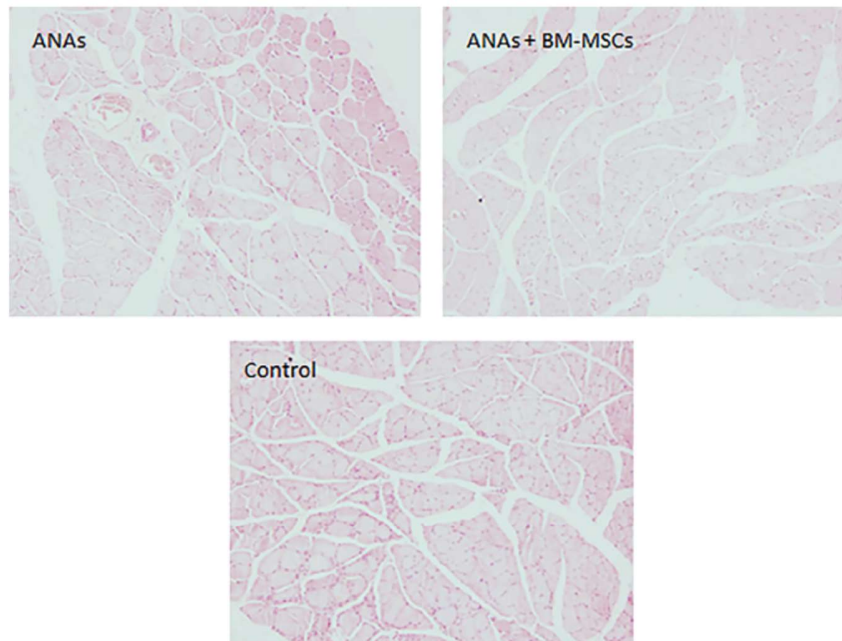
No significant differences were observed between groups in fiber diameter and fiber area. No significant differences were found either in the percentage of myelinated and non-myelinated fibers. However, there was a significant difference between groups in the total number

of fibers, this being statistically greater in control group ( $p < .01$ ) (Figure 6).

## 4 | DISCUSSION

Brachial plexus treatment is far from providing ideal results, requiring in most cases that we assume added morbidity in nerve graft donor areas and sacrifice the function of the transferred nerve. This study aims to compare three types of nerve graft in an experimental model for brachial plexus injuries that is simple, easily reproducible and also offers versatility to generate new study models.

The literature supports the murine model for the pathology of the brachial plexus (Angélica-Almeida et al., 2013). There are small anatomical variations in terms of the topography if we compare it with human. The most significant is the contribution of the C7 roots to the musculocutaneous nerve, as described by Bobkiewicz et al, since in humans it consists of C5 and C6 (Bobkiewicz et al., 2017). This contribution does not interfere with the model, since, in order to carry out the transfer, although the lesion is selective of the superior roots, the complete section is made at the proximal level of the musculocutaneous nerve, which avoids a possible reinnervation through C7.



**FIGURE 3** Hematoxylin-eosin stain from sections of the biceps muscle of the ANAs group, ANAs + BM-MSCs group and control group. The similarities in the histomorphology in the three groups can be observed. (magnification  $\times 10$ ). ANAs, acellular nerve allografts; MSCs, mesenchymal stem cells

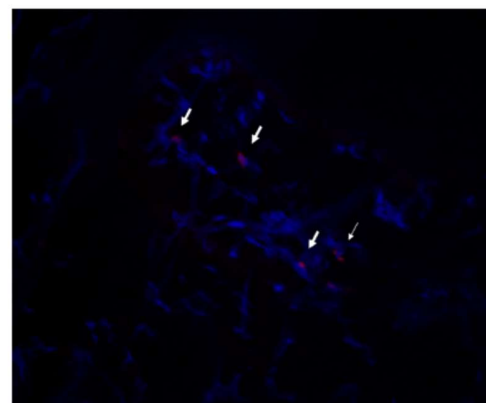
### 3.1 | Electrophysiological findings

Statistically significant differences were observed in the electromyography, both in the amplitude of the CMAPs, which was significantly higher in control group ( $0.04388 \pm 0.02$  volts) compared with ANAs + BM-MSCs group ( $0.02275 \pm 0.02$  volts,  $p = .026$ ) and in the latency of the CMAPs, which was significantly lower in the control group ( $2.48 \pm 0.47$  ms) compared with ANAs group ( $4.38 \pm 0.78$  milliseconds,  $p = .001$ ) and ANAs + BM-MSCs group ( $4.08 \pm 0.85$  ms,  $p = .002$ ) (Figure 2), but not between the two experimental groups ( $p > .05$ ) (Table 1).

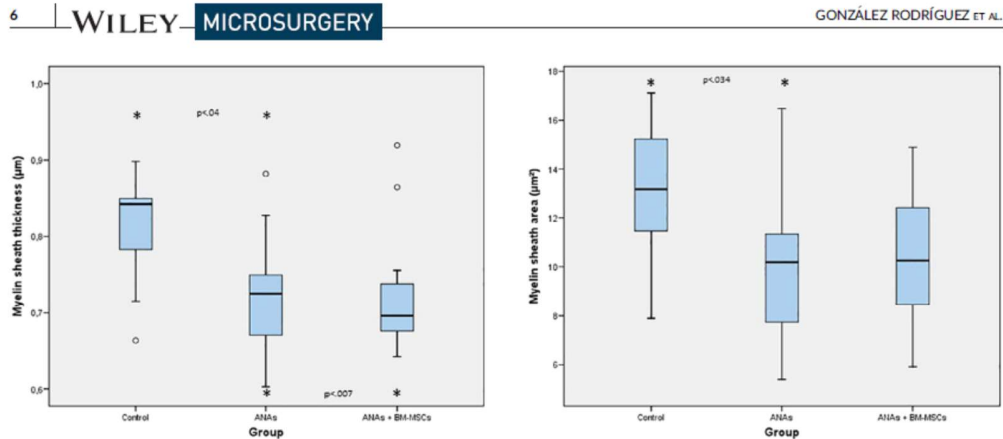
The differences found in the electroneurography between the groups, when analyzing the NAPs, were not statistically significant, but the drift of the data suggests action potentials with greater amplitude and lower latency in the control group with respect to the experimental groups.

### 3.2 | Histological findings

In the hematoxylin eosin preparations from the biceps muscle, no differences were observed in the histomorphology between the groups,



**FIGURE 4** Immunofluorescence of nerve graft sections from ANAs + BM-MSCs group. Cell nuclei marked with DAPI (blue) and MSCs marked with Dil (red). White arrows point to MSCs. (magnification  $\times 20$ ). ANAs, acellular nerve allografts; MSCs, mesenchymal stem cells



**FIGURE 5** Differences in the thickness and the area of the myelin sheath between the groups. No statistically significant differences were found between the experimental groups, but there were differences in the thickness between both and the control group. The control group presents a larger area than the experimental groups, finding statistical significance in this difference with ANAs group. Outliers are represented as circles. \* $p < .05$ . ANAs, acellular nerve allografts

**TABLE 2** Statistical analysis of the electronic microscopy findings. No statistically significant differences have been found between groups ANAs and ANAs + BM-MSCs in the thickness and the area of the myelin sheath. \* $p < .05$  statistically significant

	Amplitude (V) mean $\pm$ SD	Comparison with control	Latency (ms) mean $\pm$ SD	Comparison with control
Control	0.81 $\pm$ 0.07		13.09 $\pm$ 2.67	
ANAs	0.72 $\pm$ 0.08	* $p = .04$	10.01 $\pm$ 2.97	* $p = .034$
ANAs + BM-MSCs	0.72 $\pm$ 0.07	* $p = .007$	10.44 $\pm$ 2.61	$p = .068$

Abbreviations: ANAs, acellular nerve allografts; MSCs, mesenchymal stem cells.

neither in the size of the cells nor the architecture of the tissue (Figure 3).

Fluorescence was observed in ANAs + BM-MSCs group in relation to the presence of MSCs preoperatively marked with Dil dye, which indicates their survival in the implanted tissue (Figure 4).

### 3.3 | Electron microscopy findings

The data analysis revealed a statistically significant difference between the groups when analyzing the thickness of the myelin sheath of the fibers, which was significantly greater in the control group (0.81  $\pm$  0.07  $\mu\text{m}$ ) compared with ANAs group (0.72  $\pm$  0.08  $\mu\text{m}$ ,  $p = .04$ ) and ANAs + BM-MSCs group (0.72  $\pm$  0.07  $\mu\text{m}$ ,  $p = .007$ ), and the area of the myelin sheath, which was significantly greater in control group (13.09  $\pm$  2.67  $\mu\text{m}^2$ ) compared with ANAs group (10.01  $\pm$  2.97  $\mu\text{m}^2$ ,  $p = .034$ ) (Figure 5), but not between the two experimental groups (Table 2).

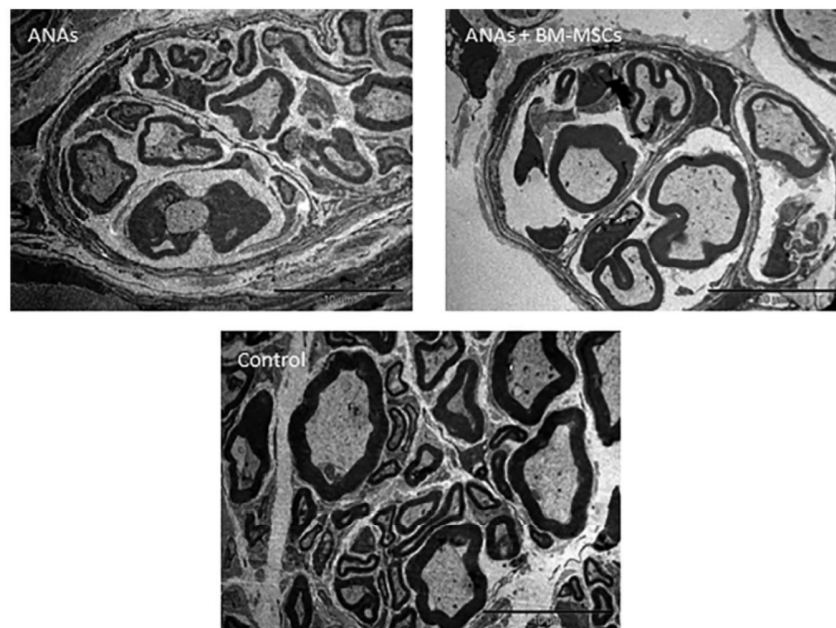
No significant differences were observed between groups in fiber diameter and fiber area. No significant differences were found either in the percentage of myelinated and non-myelinated fibers. However, there was a significant difference between groups in the total number

of fibers, this being statistically greater in control group ( $p < .01$ ) (Figure 6).

## 4 | DISCUSSION

Brachial plexus treatment is far from providing ideal results, requiring in most cases that we assume added morbidity in nerve graft donor areas and sacrifice the function of the transferred nerve. This study aims to compare three types of nerve graft in an experimental model for brachial plexus injuries that is simple, easily reproducible and also offers versatility to generate new study models.

The literature supports the murine model for the pathology of the brachial plexus (Angélica-Almeida et al., 2013). There are small anatomical variations in terms of the topography if we compare it with human. The most significant is the contribution of the C7 roots to the musculocutaneous nerve, as described by Bobkiewicz et al., since in humans it consists of C5 and C6 (Bobkiewicz et al., 2017). This contribution does not interfere with the model, since, in order to carry out the transfer, although the lesion is selective of the superior roots, the complete section is made at the proximal level of the musculocutaneous nerve, which avoids a possible reinnervation through C7.



**FIGURE 6** Transmission electron microscopy of nerve grafts from ANAs, ANAs + BM-MSCs and control groups. The preservation of the basement membrane can be seen, as well as the greater diameter of the myelin sheath in the control group. (magnification  $\times 4000$ ). ANAs, acellular nerve allografts; MSCs, mesenchymal stem cells

Bertelli et al., contrary to Greene's proposal, showed that the biceps muscle was only innervated by the musculocutaneous nerve, but they found, 1 month after denervation, that rats which had only the musculocutaneous nerve sectioned scored higher in the grooming test than those which had both the musculocutaneous nerve and the deep branch of the radial nerve sectioned (Bertelli et al., 1995). In our study, the presence of elbow flexion synchronously with respiration by the action of the phrenic nerve was evaluated, and therefore the possible interference of the radial nerve function does not influence our evaluation.

The main limitation of the model, apart from the anatomical differences compared to the human plexus, is the possibility of spontaneous reinnervation as described by Mackinnon et al. in a sciatic nerve model, where, after 5 months, they observed spontaneous reinnervation of a nerve section with resection of 1 cm of nerve tissue (Mackinnon et al., 1985). It is true that this effect has not been demonstrated in shorter postoperative times, but it is a factor to be taken into consideration. This is why we resected 3 mm of nerve tissue to minimize the risk of spontaneous reinnervation.

Although there are already studies such as those of Fang et al., which are oriented toward the treatment of preganglionic lesions, addressing them at the avulsed roots level, exposure, especially of the higher roots, is still very complex, and more research is required in this

regard (Fang et al., 2018), and therefore the use of nerve transfers continues to be the most viable option. Bergmeister et al. have shown that the use of nerve transfers without an interposition graft can hyper innervate the target muscles, generating neurophysiological changes in them, which allows a functional recovery in many cases close to normal (Bergmeister et al., 2019).

Zhang et al. with the transfer of the phrenic nerve to the musculocutaneous nerve, showed a good result in terms of survival of motor neurons, as well as nerve regeneration and reinnervation of the biceps (Zhang et al., 2004). With the exception of the study by Yang et al., which presents a model using contralateral C7 (Yang et al., 2019), our model is, as far as we know, the first time that an acellular nerve graft associated with BM-MSCs has been presented as a bridge for a transfer from the phrenic nerve to the musculocutaneous nerve.

The choice of the phrenic nerve as a donor has always been very controversial, due to the possibility of generating respiratory disorders. There are studies describing end-to-side transfers to minimize possible sequelae (Jia et al., 2018), but at the moment they have not been shown to achieve a result comparable to the use of end-to-end suture. Since we wished to represent a model as close to reality as possible, we decided to use the phrenic nerve, considering the rest of the options available to restore shoulder stability. It is also true that, due to its anatomical origin, the phrenic nerve can be damaged in

upper trunk lesions, in this case, it would be necessary to consider using other options such as the spinal accessory nerve (Chuang et al., 1995).

As in the study by Zhang et al, we evidenced the first data of biceps muscle contraction synchronously with breathing between the third and fourth week after surgery (Zhang et al., 2004). None of the animals achieved voluntary control for elbow flexion. The position of the animal, with its cephalic portion oriented toward the researcher, was key for the proper approach, which not only gave us easier access to the structures, but also allowed us to perform the surgical technique more easily (Bobkiewicz et al., 2017).

Several studies in animal models show positive results in reinnervation by associating BM-MSCs (Goel et al., 2009; Kurwale et al., 2015). Despite not having found statistically significant differences in our model when comparing the groups with and without stem cells, as evidenced by other studies such as that of Zhao et al. or Wang et al. (Zhao et al., 2014; Wang et al., 2012), we can affirm that decellularized nervous tissue has functioned as a support structure for them, as proposed by Tang et al. (Tang et al., 2013), since in fluorescence studies their survival 12 weeks post-implantation could be observed. The studies by Fan et al. show a favorable effect of stem cells in terms of immunomodulatory capacity, reducing pro-inflammatory factors, in addition to a clear superiority of Schwann-like cells compared to stem cells from bone marrow (Fan et al., 2014a; Fan et al., 2014b). It should be noted that the study by Wang et al. did not find statistically significant differences, as in our work, between acellular grafts with and without stem cells when the thickness of the myelin fibers was analyzed (Wang et al., 2012). It is possible that one of the key factors was to create an optimal microenvironment that facilitated their cellular differentiation into Schwann-like cells, maximizing their plasticity potential (Tohill & Terenghi, 2004).

In our study we once again confirmed that the results obtained with the use of ANAs are far from being those obtained with autografts, and we found that the addition of BM-MSCs failed to provide a sufficient improvement in the parameters of nerve regeneration under study. However we found no differences between the two experimental groups, we consider the model to be relevant, since there are few studies of this type focused on brachial plexus repair, showing the need to encourage the development of new alternatives. We consider that the possible clinical application of ANAs enriched with BM-MSCs should be based on new experimental studies that optimize the creation of a microenvironment that facilitate cell differentiation.

## 5 | CONCLUSIONS

This experimental study presents a new model for the study of selective lesions of the upper trunk and again validates the autologous graft as the gold standard (Sayad-Fathi et al., 2019), finding statistically significant differences in the amplitude and latency of the CMAP, as well as in the thickness of myelin sheath area, when compared with acellular nerve grafts, when used alone or when associated with BM-

MSCs. The addition of BM-MSCs to the ANAs fails to provide statistically significant differences in the variables under study.

## ACKNOWLEDGMENTS

Funding for open access charge: A Coruña University/CISUG.

## DATA AVAILABILITY STATEMENT

The data that supports the findings of this study are available from the corresponding author upon request.

## ORCID

Alba González Rodríguez  <https://orcid.org/0000-0003-2618-2562>

Maria C. Arufe  <https://orcid.org/0000-0003-3725-0743>

## REFERENCES

- Angélica-Almeida, M., Casal, D., Mafra, M., Mascarenhas-Lemos, L., Martins-Ferreira, J., Ferraz-Oliveira, M., Amarante, J. M., & Goyri-O'Neill, J. E. (2013). Morfologia e Vascularização do Plexo Braquial no Rato Wistar. *Acta Médica Portuguesa*, 28(3), 243–250.
- Bergmeister, K. D., Aman, M., Muceli, S., Vujaklija, I., Manzano-Szalai, K., Unger, E., Byrne, R. A., Scheinecker, C., Riedl, O., Salminger, S., Frommlet, F., Borschel, G. H., Farina, D., & Aszmann, O. C. (2019). Peripheral nerve transfers change target muscle structure and function. *Science Advances*, 5(1), eaau2956.
- Bertelli, J. A., Taleb, M., Saadi, A., Mira, J.-C., & Pecot-Dechavassine, M. (1995). The rat brachial plexus and its terminal branches: An experimental model for the study of peripheral nerve regeneration. *Microsurgery*, 16(2), 77–85.
- Bobkiewicz, A., Cwykiel, J., & Siemionow, M. (2017). Anatomic variations of brachial and lumbosacral plexus models in different rat strains: Anatomic variations of brachial and lumbosacral plexus models. *Microsurgery*, 37(4), 327–333.
- Chuang, D. C., Lee, G. W., Hashem, F., & Wei, F. C. (1995). Restoration of shoulder abduction by nerve transfer in avulsed brachial plexus injury: Evaluation of 99 patients with various nerve transfers. *Plastic and Reconstructive Surgery*, 96(1), 122–128.
- Fan, L., Yu, Z., Li, J., Dang, X., & Wang, K. (2014a). Immunoregulation effects of bone marrow-derived mesenchymal stem cells in xenogeneic acellular nerve grafts transplant. *Cellular and Molecular Neurobiology*, 34(7), 999–1010.
- Fan, L., Yu, Z., Li, J., Dang, X., & Wang, K. (2014b). Schwann-like cells seeded in acellular nerve grafts improve nerve regeneration. *BMC Musculoskeletal Disorders*, 15, 165.
- Fang, J., Yang, J., Yang, Y., Li, L., Qin, B., He, W., Yan, L., Chen, G., Tu, Z., Liu, X., & Gu, L. (2018). A novel rat model of brachial plexus injury with nerve root stumps. *Journal of Neuroscience Methods*, 295, 1–9.
- Goel, R. K., Suri, V., Suri, A., Sarkar, C., Mohanty, S., Sharma, M. C., Yadav, P. K., & Srivastava, A. (2009). Effect of bone marrow-derived mononuclear cells on nerve regeneration in the transection model of the rat sciatic nerve. *Journal of Clinical Neuroscience Official Journal of the Neurosurgical Society Australas*, 16(9), 1211–1217.
- Jia, X., Chen, C., Yang, J., & Yu, C. (2018). End-to-side neurotization with the phrenic nerve in restoring the function of toe extension: An experimental study in a rat model. *Journal of Plastic Surgery and Hand Surgery*, 52(3), 185–188.
- Karabekmez, F. E., Duymaz, A., & Moran, S. L. (2009). Early clinical outcomes with the use of decellularized nerve allograft for repair of sensory defects within the hand. *Hand (New York)*, 4(3), 245–249.
- Kolar, M. K., & Kingham, P. J. (2014). Regenerative effects of adipose-tissue-derived stem cells for treatment of peripheral nerve injuries. *Biochemical Society Transactions*, 42(3), 697–701.



- Kurwale, N. S., Suri, V., Srivastava, A., Suri, A., Mohanti, S., Yadav, P., Sharma, M. C., & Sarkar, C. (2015). Role of bone marrow derived pluripotent stem cells in peripheral nerve repair in adult rats: A morphometric evaluation. *Journal of Neuroscience in Rural Practice*, 6(2), 152–159.
- Limthongthang, R., Bachoura, A., Songcharoen, P., & Osterman, A. L. (2013). Adult brachial plexus injury: Evaluation and management. *The Orthopedic Clinics of North America*, 44(4), 591–603.
- Mackinnon, S. E., Hudson, A. R., & Hunter, D. A. (1985). Histologic assessment of nerve regeneration in the rat. *Plastic and Reconstructive Surgery*, 75(3), 384–388.
- Sayad-Fathi, S., Nasiri, E., & Zaminy, A. (2019). Advances in stem cell treatment for sciatic nerve injury. *Expert Opinion on Biological Therapy*, 19(4), 301–311.
- Sondell, M., Lundborg, G., & Kanje, M. (1998). Regeneration of the rat sciatic nerve into allografts made acellular through chemical extraction. *Brain Research*, 795(1), 44–54.
- Tang, P., Kilic, A., Konopka, G., Regalbuto, R., Akelina, Y., & Gardner, T. (2013). Histologic and functional outcomes of nerve defects treated with acellular allograft versus cabled autograft in a rat model. *Microsurgery*, 33(6), 460–467.
- Tohill, M., & Terenghi, G. (2004). Stem-cell plasticity and therapy for injuries of the peripheral nervous system. *Biotechnology and Applied Biochemistry*, 40(1), 17–24.
- Tung, T. H., & Mackinnon, S. E. (2010). Nerve transfers: Indications, techniques, and outcomes. *Journal of Hand Surgery*, 35(2), 332–341.
- Vasudevan, S., Yan, J. G., Zhang, L. L., Matloub, H. S., & Cheng, J. J. (2013). A Rat Model for Long-Gap Peripheral Nerve Reconstruction. *Plastic and Reconstructive Surgery*, 132(4), 871–876.
- Wang, Y., Zhao, Z., Ren, Z., Zhao, B., Zhang, L., Chen, J., Xu, W. J., Lu, S., Zhao, Q., & Peng, J. (2012). Recellularized nerve allografts with differentiated mesenchymal stem cells promote peripheral nerve regeneration. *Neuroscience Letters*, 514(1), 96–101.
- Yang, J. T., Fang, J. T., Li, L., Chen, G., Qin, B. G., & Gu, L. Q. (2019). Contralateral C7 transfer combined with acellular nerve allografts seeded with differentiated adipose stem cells for repairing upper brachial plexus injury in rats. *Neural Regeneration Research*, 14(11), 1932–1940.
- Zhang, C. G., Ma, J. J., Terenghi, G., Mantovani, C., & Wiberg, M. (2004). Phrenic nerve transfer in the treatment of brachial plexus avulsion: An experimental study of nerve regeneration and muscle morphology in rats. *Microsurgery*, 24(3), 232–240.
- Zhao, Z., Wang, Y., Peng, J., Ren, Z., Zhang, L., Guo, Q., Xu, W., & Lu, S. (2014). Improvement in nerve regeneration through a decellularized nerve graft by supplementation with bone marrow stromal cells in fibrin. *Cell Transplantation*, 23(1), 97–110.

**How to cite this article:** González Rodríguez, A., González Porto, S. A., Comellas Melero, N., & Arufe, M. C. (2021). Acellular nerve graft enriched with mesenchymal stem cells in the transfer of the phrenic nerve to the musculocutaneous nerve in a C5-C6 brachial plexus avulsion in a rat model. *Microsurgery*, 1–9. <https://doi.org/10.1002/micr.30829>

## **B. Anexo:**

**Informe del comité ético de experimentación  
animal de la XXIAC**





### INFORME DEL COMITÉ ÉTICO DE EXPERIMENTACIÓN ANIMAL DE LA XXIAC

Dña. María Ríos Neira, como secretaria del Comité Ético de Experimentación Animal de la XXIAC

DECLARO:

1. Que el siguiente proyecto:

**Estudio comparativo de reinervación en lesión completa de plexo braquial: modelo experimental en ratas.**

2. Que tiene una duración de: 1 año 5 meses

3. Que se llevará a cabo por personas capacitadas o autorizadas de forma temporal en las condiciones establecidas en el artículo 15.3 del RD 53/2013 bajo supervisión responsable.

4. Que se realiza en un centro usuario autorizado.

5. Que se realizará de forma que se evite a los animales cualquier dolor, sufrimiento, angustia o daño duradero que sean innecesarios.

6. Que se tomarán las medidas adecuadas para minimizar el sufrimiento animal una vez conseguida la finalidad de los procedimientos.

7. Que ha sido revisado de acuerdo a la normativa vigente.

8. Que el centro donde se lleva a cabo el proyecto posee programas de aclimatación y aprendizaje adecuados para los animales según los procedimientos y la duración del proyecto.

9. Que ha sido revisado basándose en las reuniones internas desarrolladas por el CEEA de la XXIAC en las siguientes fechas:

Código y fecha de reunión: **2015/R02, 01/07/2015**

Código y fecha del acta de reunión: **2015/R02, 01/07/2015**

CONFIRMO:

Que el proyecto sometido a este informe del CEEA, una vez examinada toda la documentación presentada, se clasifica como: FAVORABLE

Secretaría Órgano Habilitado	Presidente Órgano Habilitado
Nombre: María Ríos Neira	Nombre: Alberto Centeno Cortés
Fecha: 24/7/2015	Fecha: 24/7/2015
Firma: 	Firma: 





## **C. Anexo:**

**Datos crudos**



Group	Age (days)	Weight (g)	Elbow flexion (days)	CMAPS		Myelin sheath			
				Amplitude(V)	Latency (s)	Thickness ( $\mu\text{m}$ )mean	Thickness ( $\mu\text{m}$ )dt	Area ( $\mu\text{m}^2$ )mean	Area ( $\mu\text{m}^2$ )dt
Control	71		18	0,05849	0,00305	0,78	0,21	13,11	8,67
	71		22	0,06375	0,00258	0,84	0,19	13,24	9,41
	72	312	20	0,01389	0,00196	0,82	0,14	10,02	4,52
	72	330	24						
	73	270	19	0,05182	0,00204	0,9	0,23	17,12	9,31
	73	280	21	0,0394	0,00321	0,87	0,19	16,29	10,4
	74	345	20	0,0595	0,00204	0,79	0,25	14,86	7,7
	74	350	22	0,0298	0,00251	0,85	0,18	12,67	5,66
	74	345	18			0,66	0,12	7,9	3,84
	74	326	19	0,0344	0,00243	0,71	0,22	10,91	7,79
	87	363	21			0,85	0,17	12,02	4,89
	87	317	20			0,85	0,2	13,36	6,43
	87	297	25			0,85	0,18	15,59	9,1
ANAs	77	380	19	0,04785	0,00345	0,6	0,08	10,43	4,94
	77	333	23	0,02204	0,00439	0,64	0,12	8,15	4,74
	74	344	17	0,0248	0,00392	0,83	0,22	10,23	5,63
	74	368	20		0,00407	0,88	0,32	16,47	12,06
	75	335	25			0,66	0,13	9,85	6,75
	75	345	23			0,74	0,13	5,39	3
	75	324	20	0,02722	0,00426	0,75	0,19	12,79	6,12
	78	367	25			0,68	0,15	10,15	4,98
	66	302	19	0,0289	0,00595	0,75	0,17	7,32	4,41
	66	272	20	0,01571	0,00371	0,74	0,14	11,73	5,33
	66	304	19	0,02256	0,00523	0,69	0,12	10,96	9,6
66	298	23	0,0129	0,00448	0,71	0,13	6,64	3,28	
ANAs+B M-MSCs	83	298	23	0,01351	0,0035	0,69	0,13	10,5	5,42
	83	304	25			0,68	0,09	14,88	6,8
	66	289	22			0,7	0,19	5,92	3,5
	70	285	24	0,01167	0,00404	0,69	0,13	8,46	3,19
	86	345	21	0,00293	0,0047	0,64	0,12	12,41	6,83
	86	368	19	0,00208	0,00266	0,86	0,17	10,23	5,13
	77		23	0,0134	0,00415	0,64	0,11	8,43	4,33
	92		17	0,03415	0,00459	0,68	0,12	8,46	4,86
	77	374	20	0,03862	0,00366	0,72	0,19	10,27	4,23
	92	330	25	0,01346	0,00535	0,75	0,14	12,87	5,53
	92	375	20	0,0358	0,00392	0,74	0,14	9,14	3,42
	92	345	18	0,0301	0,00517	0,69	0,13	13,38	6,54
	99	415	19	0,0239	0,00448	0,92	0,17	12,3	5,78
	99	345	21			0,68	0,12	9,83	5,36
	99	408	20	0,0534	0,00276	0,71	0,13	8,35	5,45
	93	345	25			0,76	0,21	11,16	4,41
93	379	19			0,71	0,19	6,5	2,76	
93	358	22			0,65	0,07	14,83	2,99	



Group	Fiber						
	Diameter ( $\mu\text{m}$ )mean	Diameter ( $\mu\text{m}$ )dt	Area ( $\mu\text{m}^2$ )mean	Area ( $\mu\text{m}^2$ )dt	Myelin	Non- myelin	% myelinated
Control	3,5	1,44	11,22	8,93	54	85	38,85
	2,77	1,39	7,51	8,23	40	23	63,49
	2,52	1,12	5,93	5,88	36	52	40,91
	3,77	1,52	12,98	9,07	29	75	27,88
	3,37	1,39	10,41	7,91	37	36	50,68
	3,92	1,12	13,02	7,41	37	67	35,58
	2,96	1,09	7,8	5,53	45	112	28,66
	2,6	0,98	6,02	4,1	41	32	56,16
	3,45	1,37	10,78	8,16	32	47	40,5
	2,83	1	7,03	4,8	41	60	40,59
3,1	1,19	8,6	6,22	28	55	33,73	
3,55	1,54	11,7	9,89	40	71	36,06	
ANAs	3,95	1,46	16,1	15,55	36	66	35,29
	3,08	1,53	9,24	8,01	33	39	45,83
	2,92	1,21	7,82	5,99	37	28	56,06
	3,89	1,52	13,64	9,95	41	39	51,25
	3,12	1,76	9,99	14,5	29	74	28,16
	1,5	0,7	1,78	1,65	35	39	47,3
	4,42	1,54	17,14	11,9	41	30	57,75
	3,41	1,46	10,75	10,09	32	19	62,75
	2,14	0,8	4,08	3,35	33	19	63,46
	3,72	1,17	11,92	7,93	35	20	63,64
	3,8	3,16	18,94	40,99	32	27	54,24
1,82	0,77	3,05	2,64	32	12	72,73	
ANAs+BM- MSCs	3,8	1,53	13,12	10,25	31	73	29,81
	5,65	2,41	29,38	23,31	15	50	23,08
	2,1	0,9	4,07	3,75	30	27	52,63
	2,88	1,04	7,32	5,81	36	25	59,02
	5,43	2,84	29,32	34,28	35	45	43,75
	2,7	1,01	6,51	4,37	32	20	61,54
	3,27	1,07	9,26	6,56	32	54	37,21
	3,11	1,39	9,09	8,3	30	46	39,47
	3,37	0,7	9,32	3,64	31	26	54,39
	4,39	1,47	16,75	11,39	36	28	56,25
	3,08	1,17	8,47	6,85	30	50	37,5
	5,61	2,25	28,41	21,4	32	42	43,24
	2,91	0,95	7,31	3,94	31	40	43,66
	3,31	1,22	9,66	8,34	37	27	57,81
	2,9	2,9	7,72	6,34	30	45	40
3,4	0,75	9,48	4,01	31	37	45,59	
2,06	0,74	3,72	2,72	34	28	54,84	
6,01	1,34	29,48	12,66	33	52	38,82	