

INYECCIÓN INTRAMUSCULAR DE CÉLULAS MADRE MESENQUIMALES DE MÉDULA ÓSEA CON UNA NEURORRAFIA PARA LA REPARACIÓN DE UNA PEQUEÑA SEPARACIÓN EN EL NERVIO PERIFÉRICO.

Peiji Wang*, Yong Zhang, Jiaju Zhao, Bo Jiang

Departamento de Cirugía de manos y pies del segundo Hospital Afiliado de la Universidad de Soochow, No.1055 Sanxiang Road, Suzhóu, Jiangsu 215004, PR China.

RESUMEN:

Anteriormente habíamos informado de que con una neurorrafia de una pequeña brecha y la unión de la manga del epineuro, se podría mejorar la tasa y la calidad de la regeneración nerviosa periférica. Hasta la fecha, la implantación y la administración sistémica de células madre mesenquimales de médula ósea (BMSC) se han utilizado habitualmente con tejidos nervios, pero cada una tiene algunas limitaciones intrínsecas. Hemos formulado la hipótesis, de que sería aconsejable la administración de BMSCs capaces de alcanzar el nervio dañado. En este estudio investigamos la eficacia de la terapéutica del trasplante de BMSCs a través de la inyección muscular dirigida con una pequeña neurorrafia en la brecha mediante el tijeo y la unión de la manga del epineuro para la reparación del nervio periférico en un modelo de rata. Una semana después de la lesión del nervio periférico en las ratas, se dividieron al azar treinta y seis ratas Sprague-Dawley en tres grupos (n = 12): El grupo para la BMSC Intramuscular (IM), el grupo de la inyección intravenosa de BMSC (IV) y el grupo con la inyección intramuscular con solución tamponada con fosfato (PBS). El proceso para la regeneración del nervio fue ensayado funcional y morfológicamente. Los resultados indicaron que en comparación con los grupos con los tratamientos IV y PBS, el grupo en el que se administró la inyección muscular dirigida, dio como resultado efectos mucho más beneficiosos, como lo demuestran los incrementos en el índice de la función ciática, la velocidad de conducción nerviosa, el espesor de la vaina de mielina y la tasa de restauración del peso húmedo del músculo gastrocnemio. En conclusión, la terapia de combinación de la neurorrafia de la brecha y el trasplante de BMSC a través de la inyección muscular dirigida, puede promover significativamente la regeneración del nervio periférico y mejorar la recuperación funcional del nervio, lo que puede ayudar a establecer un enfoque fiable para la reparación de la lesión del nervio periférico.

Palabras clave: células madre mesenquimales de médula ósea, pequeña brecha, trasplante, regeneración de los nervios periféricos, inyección intramuscular

1. INTRODUCCIÓN

La neurorrafia de extremo a extremo del perineurio o epineuro, para la recuperación de la continuidad del nervio, ha sido el método de reparación más comúnmente utilizado para la mutilación del nervio periférico. Sin embargo, en muchos de los casos, la recuperación funcional es insatisfactoria. Desde que la teoría de la regeneración selectiva de nervio fue propuesta, muchos investigadores se han centrado en el uso de tejidos autólogos y de conductos biodegradables para construir cámaras de regeneración nerviosa. Los materiales autólogos, tales como la arteria, vena o fascia, tienen muchas limitaciones, incluyendo los recursos del injerto, los requisitos de que la localización del sitio donante, esté localizado distante del sitio quirúrgico y que la longitud o el diámetro sean insuficiente para optimizar la reparación. Aunque los conductos sintéticos han superado los problemas mencionados anteriormente, su aplicación clínica está limitada por los altos costes y por los posibles cuerpos extraños para el anfitrión. Para mejorar el resultado funcional y reducir las complicaciones de las reparaciones de los nervios periféricos, hemos propuesto, la realización de una pequeña neurorrafia de la brecha y la unión de la manga del epineuro autólogo, para construir una cámara de regeneración nerviosa, para la reparación en mutilaciones del nervio periférico.

En estudio anteriores, se ha demostrado que este método podría mejorar el efecto de la regeneración nerviosa y podría ser un enfoque alternativo eficaz para la reparación de la mutilación del nervio periférico. Estudios anteriores han demostrado que las células

madre de la médula ósea mesenquimales (BMSC) pueden diferenciarse en células similares a células de Schwann y apoyar la regeneración de los nervios, después de su trasplante en diferentes modelos de lesión del nervio periférico.

A pesar de que las BMSCs tienen la capacidad de enraizar específicamente en un área dañada, el número de BMSCs detectadas en estos tejidos, es extremadamente bajo. Por lo tanto, la entrega eficiente de las BMSC en los sitios de acción previstos es necesaria. Actualmente, el trasplante de células madre para el tratamiento de la lesión nerviosa, se realiza mediante inyección local e intravenosa; sin embargo, ambos métodos tienen algunas limitaciones. Las investigaciones han demostrado, que los factores neurotróficos exógenos a través de la inyección en una esclerosis lateral amiotrófica, en un modelo de rata podría expresarse en las células del cuerno anterior de la médula espinal y prolongar el tiempo de supervivencia de las ratas. Por lo tanto, deducimos que el trasplante de las BMSC vía inyección muscular dirigida, podría promover la regeneración nerviosa y prevenir la atrofia muscular denervada. El objetivo del presente estudio fue evaluar la eficacia terapéutica del trasplante de BMSC a través de la inyección intramuscular combinada con una pequeña neurorrafia por intersecciones y la unión de la manga del epineuro para la mutilación de los nervios periféricos en modelos de ratas.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1. ANIMALES

Cuarenta y seis ratas machos Sprague-Dawley (SD) que pesaban entre 200 - 250 g fueron proporcionados por el centro animal

experimental de la universidad de Soochow, China [Certificación No. SYXK (Su) 2007-0035]. Todos los animales experimentales se alojaron bajo condiciones estándar. Estos animales fueron anestesiados mediante inyección intraperitoneal de cloral hidrato (350 mg/kg de peso), durante el procedimiento quirúrgico, todos los protocolos fueron revisados y aprobados por el laboratorio institucional de cuidado animal y el comité de uso, y se llevó a cabo de conformidad con la guía del Institutos Nacional de Salud para el cuidado y uso de animales para procedimientos experimentales. Se hicieron todos los esfuerzos minimizar tanto el número como el sufrimiento de los animales utilizados.

2.2. AISLAMIENTO Y CULTIVO DE BMSCS

Se sacrificaron diez ratas SD, mediante una dosis letal de hidrato de cloral. Las BMSC se aislaron de los fémures bilaterales como se ha descrito anteriormente y se cultivaron en un medio Eagle Dulbecco Modificado (DMEM) Glucosa Baja (L-DMEM, Gibco, USA), el cual contenía 10% de suero bovino (FBS, Gibco, EE.UU.) y penicilina / estreptomycin al 1% al 95% de humedad con 5% de CO₂ a 37 ° C. Las BMSC en el paso 3 se usaron para experimentos adicionales. La morfología de las BMSC se examinó en cada pasaje, mediante microscopía de contraste de fase invertida (IMT-2, Olympus, Japón).

2.3. ANÁLISIS DE CITOMETRÍA DE FLUJO DE LAS BMSCS

Se realizó un análisis de citometría de flujo para caracterizar los fenotipos de las BMSC cultivadas. Brevemente, las BMSC en el paso 3 fueron lavadas dos veces con solución tamponada con fosfato (PBS, Gibco, USA),

luego se tripsinizaron con tripsina al 0,25% (Sigma, USA) en suspensión celular, se centrifugaron durante 5 min a 800 rpm y se ajustaron la densidad de las células de 1×10^6 células/ml aproximadamente. A continuación, 100\ml de la suspensión de las células se incubó con anticuerpos monoclonales contra ratón CD29, CD34, CD45, CD90 (All BD Biosciences, EE.UU.) durante una noche a 4 °C. Las células se lavaron dos veces en PBS y se incubaron con anticuerpo anti-rata CD29-FITC, CD34-PE, CD45-Alexa Fluor 647 y CD90-PerCP / Cy5.5 (todos de BD Biosciences, USA) como un anticuerpo secundario a temperatura ambiente durante 60 min. El análisis de citometría de flujo se realizó después de los dos lavados finales en PBS, usando un aparato de citofotometría FACS Calibur, combinado con el Software Cell Quest Pro (BD Biosciences, EE.UU.).

2.4. PROCEDIMIENTO QUIRÚRGICO

Los modelos de rata con neurorrafia en una pequeña brecha, para reparar la ruptura del nervio periférico utilizando una cámara para la regeneración de nervios se llevó a cabo mediante escisión y unión de manguito del epineuro autólogo, como se describió anteriormente. Se utilizaron 36 ratas SD macho. Resumiendo, después de que la anestesia hiciese su efecto, se expuso el nervio ciático izquierdo desde la muesca ciática hasta su bifurcación en la región tibial y el nervio peroneal. El nervio ciático se cortó 10 mm por encima la bifurcación del nervio ciático. Se disoció y se eliminó una sección anular de epineuro de 1 mm de longitud; en el muñón distal, se incidió longitudinalmente un segmento del epineuro de 3 mm de longitud; luego diseccionamos el epineuro para separar

el epineuro y el haz del nervio con las tijeras. Después de que el epineuro se disoció de proximal a distal, el haz de nervios se cortó en la cumbre de la incisión longitudinal. Después de tirar del epineuro distal, creamos un manguito para unirlo con el epineuro del nervio proximal con un espacio de 2 mm entre los dos tocones nerviosos. El epineuro de los dos tocones se suturó en el sitio sin tensión a 1mm de distancia del muñón del nervio proximal con 10-0 puntadas (Prolene, Ethicon, EE.UU.). Luego se suturó el epineuro diseccionado de manera longitudinal, seguido por la capa muscular y la piel.

2.5. GRUPOS Y PROCEDIMIENTO DE TRASPLANTE

Una semana después de la neurografía, las BMSC utilizadas para los estudios cualitativos (inmunohistoquímico) se marcaron con 5-bromo-2-desoxiuridina (BrdU, Abcam, UK), 48 horas antes del trasplante, se prepararon para el estudio aproximadamente, 1×10^6 BMSCs en 1 ml de volumen total de líquido de PBS; se dividieron las 36 ratas al azar en tres grupos ($n = 12$): grupo I (grupo IM): se inyectaron 1 ml de suspensión de PBS y BMSC en las cabezas mediales y laterales de los músculos gastrocnemios; Grupo II (grupo IV): se inyectaron 1 ml de suspensiones de PBS y BMSC en la vena de la cola; y en el grupo III (grupo PBS): se inyectó 1 ml de PBS en las cabezas mediales y laterales del músculo gastrocnemio.

2.6. EVALUACIÓN FUNCIONAL

Un investigador que desconocía la asignación experimental, evaluó el índice de la función ciática (SFI) en las semanas 4, 8 y 12 postneurografía. En resumen, se seleccionaron

al azar 6 ratas en cada grupo, se sumergieron las superficies plantares de las patas traseras en tinta negra y se permitió que las ratas se movieran por un túnel de madera para que las huellas pudieran ser registradas en papel un blanco colocado en el fondo del túnel. El valor de SFI se calculó de acuerdo con la fórmula descrita por Bain et al. En general, para las huellas normales, el valor de la SFI fue cercano a 0, mientras que un valor de la SFI de -100 aproximadamente, reflejaba la pérdida completa de la función.

2.7. ESTUDIO ELECTROFISIOLÓGICO

El examen electrofisiológico se realizó en las semanas 4 y 12 después de las neurografías. En resumen, 6 ratas en cada grupo fueron anestesiadas, y los nervios ciáticos reparados fueron expuestos como se ha descrito anteriormente; los electrodos bipolares estimulantes se colocaron en el tronco del nervio ciático proximal y distal al sitio de la reparación, el electrodo de registro se colocó en el músculo gastrocnemio y el electrodo de tierra se colocó en el tejido subcutáneo entre los electrodos de estimulación y el registro; la distancia entre los dos sitios estimulados fue de 2,0 cm; se registraron los datos digitalizados de la latencia de inicio para el potencial de acción del músculo compuesto y la amplitud de pico; se calculó la velocidad de conducción nerviosa (NCV, m/s), utilizando un electromiograma multimedia (M314636, NHK30- Medelec Synergy, Reino Unido).

2.8. COSECHA DE TEJIDOS

A las 4 semanas después de la neurografía, y de que se llevas a cabo el examen electrofisiológico, las ratas fueron sacrificadas mediante una dosis letal de hidrato de cloral.

Los nervios regenerados, incluyendo el sitio proximal de 3 mm, la pequeña brecha y el sitio distal de 2 mm, fueron cosechados para la tinción con hematoxilina y eosina (HE) y análisis inmunohistoquímico. Los músculos gastrocnemios bilaterales fueron cuidadosamente limpiados y diseccionados, dividiendo su origen tendinoso y su inserción desde el hueso para la determinación de la tasa de recuperación del peso húmedo del músculo gastrocnemio y la tinción HE. Después de la recolección de nervios y de músculos, las ratas se perfundieron transcardialmente con una solución salina fría al 0,9%, seguido de paraformaldehído al 4% en PBS (Sinopharm, China). Para el análisis inmunohistoquímico, los segmentos L4-L6 de la médula espinal fueron cosechados y fijados en paraformaldehído al 4% durante la noche a 4 °C. Las ratas restantes se alimentaron hasta por 12 semanas después de la neurografía. Los nervios regenerados se cosecharon para la observación ultraestructural, y los músculos gastrocnemios bilaterales se cosecharon para la determinación de la tasa de recuperación del peso húmedo del músculo gastrocnemio como hemos mencionado anteriormente.

2.9. DETERMINACIÓN DE LA TASA DE RECUPERACIÓN DEL PESO HÚMEDO DEL MÚSCULO GASTROCNEMIO

Después de la cosecha, los músculos gastrocnemio izquierdo (experimental, E) y derecho (normal, N), se pesaron inmediatamente con una escala electrónica con una precisión de 0,00001 g. En cada rata se calculó la relación en peso del músculo gastrocnemio (experimental / normal, E / N) en función del peso del músculo gastrocnemio en la pierna experimental (pierna izquierda)

frente a la pierna normal (pierna derecha) según la siguiente fórmula: $E/N = \text{peso experimental} / \text{peso muscular normal}$.

2.10. ANÁLISIS MORFOMÉTRICO

Los especímenes de los nervios regenerados y del músculo gastrocnemio se fijaron en paraformaldehído al 4% y se embebieron en bloques de parafina. Los especímenes se cortaron como secciones longitudinales y se tiñeron con hematoxilina y eosina (Sinopharm, China), se colocaron bajo un microscopio óptico (BX51T-PHD-J11, Olympus, Japón), para observar la disposición de fibras nerviosas mielinizadas, las fibras musculares y el grado de atrofia muscular. Las muestras de los nervios y de las médulas espinales se lavaron en PBS y se fijaron en paraformaldehído al 4%; los portaobjetos se incubaron con el anticuerpo primario, anti-BrdU monoclonal de ratón (1: 200, Sigma, EE.UU.), después, se incubaron con el anticuerpo secundario que fuese apropiado, IgG de cabra anti-ratón conjugado con biotina (1: 200, Sigma, EE.UU.). Todas las muestras fueron examinadas bajo un microscopio (BX51T-PHD-J11, Olympus, Japón). Las muestras de los nervios se lavaron en PBS y se fijaron en una solución de glutaraldehído al 4%. Las secciones ultra finas con un espesor de 50 nm, fueron observadas bajo un microscopio electrónico de transmisión (TEM, H-600, Hitachi, Japón) y se tomaron fotografías utilizando una cámara (EOS550D, Canon, Japón) con una ampliación de 4000 × 30.000 ×.

2.11. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los datos se expresan como la media ± error estándar de la media y se analizaron mediante un análisis de varianza unidireccional

(ANOVA), seguido de la prueba post hoc de Tukey. Un valor de $p < 0,05$, fue considerado estadísticamente significativo. Los análisis estadísticos se llevaron a cabo mediante el software estadístico SPSS 17.0 (SPSS, EE.UU.).

3. RESULTADOS

3.1. Caracterización de las BMSC cultivadas

La médula ósea contiene grupos heterogéneos de células. A las 24 horas después de la deposición inicial, las células adherentes exhibían una pequeña morfología redondeada en forma de huso (figura 1A). Al 7mo. día, las BMSC adjuntas se habían transformado en una capa adherente que contenía abundantes células dispersas, semejantes a un huso (Figura 1B). Al día 14, las BMSC primarias, habían formado una capa casi continua, compuesta principalmente de células semejantes a un huso (figura 1C). En el paso 3, las células similares a fibroblastos, se volvieron morfológicamente homogéneas, con más del 80% de pureza (Figura 1D). El análisis de citometría de flujo mostró que las células eran inmunopositivas para: CD29 (93,7%, Fig. 1G) y CD90 (98,9%, Fig. 1H) e inmunonegativas para: CD34 (0,8%, Fig. 1E), CD45 (1,3%, Fig.), Indicando que las BMSC aisladas de rata, no estaban contaminadas con células de origen hematopoyético o endotelial.

3.2. RECUPERACIÓN FUNCIONAL DEL NERVIIO CIÁTICO

En las semanas 4, 8 y 12 post-neurorrafia, el valor de la SFI de los tres grupos, reveló diversos grados de mejoría. Se observó un aumento significativo en el valor de la SFI en el grupo I en comparación con los grupos II y III a las 4, 8 y 12 semanas ($p < 0,05$). No se

observaron diferencias significativas entre los grupos II y III ($p > 0,05$, Fig. 2A).

3.3. ESTUDIO ELECTROFISIOLÓGICO

En las semanas 4 y 12 post-neurorrafia, el NCV de estos tres grupos demostraron diversos grados de mejoría. Se observó una recuperación significativamente en el grupo I en comparación con el grupo II y el grupo III a las 4 y 12 semanas ($p < 0,05$). El NCV incrementó en los grupos II en comparación con el grupo III a las 4 y 12 semanas ($p < 0,05$, Fig. 2B).

3.4. DETERMINACIÓN DE LA TASA DE RECUPERACIÓN DEL PESO HÚMEDO DEL MÚSCULO GASTROCNEMIO

En las semanas 4 y 12 post-neurorrafia, en comparación con el músculo normal contralateral, en los tres grupos se observaron diferentes grados de atrofia del músculo gastrocnemio en el lado operado. En los puntos de tiempo de la semana 4 y 12 respectivamente, la tasa de recuperación del peso húmedo del músculo gastrocnemio en el grupo I fue significativamente superior al del grupo II y del grupo III ($p < 0,05$). No hubo diferencias significativas entre el grupo II y el grupo III ($p > 0,05$, Fig. 2C).

3.5. OBSERVACIONES MORFOLÓGICAS

La coloración de las secciones nerviosas mediante HE que las fibras nerviosas se organizaron regularmente y de manera uniforme con la misma tendencia en el grupo I; en el grupo III, irregular y distorsionada con una distribución irregular, y en el grupo II estuvieron en un punto intermedio (Fig. 3A). La

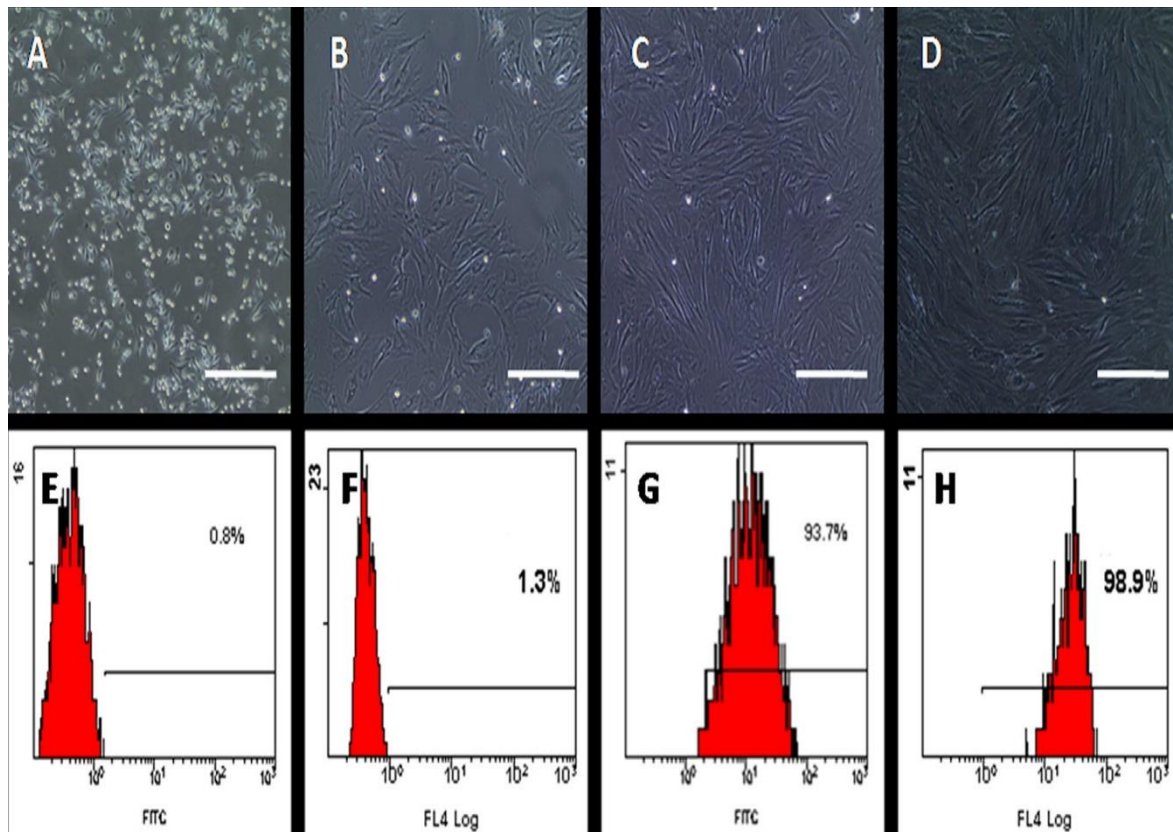


Figura. 1. La microscopía de contraste de fase reveló las características morfológicas de las BMSC cultivadas a las 24 h (A), día 7 (B), día 14 (C) y paso 3 (D). Los fenotipos de las BMSC cultivadas por análisis de citometría de flujo. (E) CD34, (F) CD45, (G) CD29 y (H) CD90. Barra de escala = 25 μ m.

tinción con HE del músculo gastrocnemio demostró grados variables de atrofia de la fibra del musculo en los tres grupos. Las fibras musculares del grupo I presentaba una atrofia de leve a moderada, pero fueron principalmente leves. El Grupo II, presentaba una atrofia de leve a moderada, con alguna atrofia severa; el grupo III, mostraba una atrofia de moderada a severa (Fig. 3B). La detección inmunohistoquímica de los muñones nerviosos y de los lados de las lesiones de los cuernos anteriores de las médulas en el grupo I y el grupo II, mostraron muchas células positivas a la BrdU (núcleos teñidos de color marrón), pero no en el grupo III; mientras tanto, el nivel de expresión positiva para BrdU en el grupo I fue mayor que en el grupo II (Fig. 3C y D).

La evaluación ultra estructural de las mitades distales de los nervios, mostraron que las vainas de mielina regenerada visualizadas en el grupo I, tenían formas redondas u ovales con una forma regular, las lamelas se dispusieron de forma compacta y gruesa sin degeneración axonal o cambios en la mielina; en el grupo II, las vainas de mielina regenerada se distorsionaron y no se observaron cambios de desmielinización; en el grupo III, las vainas de mielina regeneradas fueron más distorsionadas, con degeneración axonal y cambios de desmielinización. Las lamelas fueron las más gruesas en el grupo I, más gruesas en el grupo II y las más delgadas en el grupo III (Fig. 3E y F).

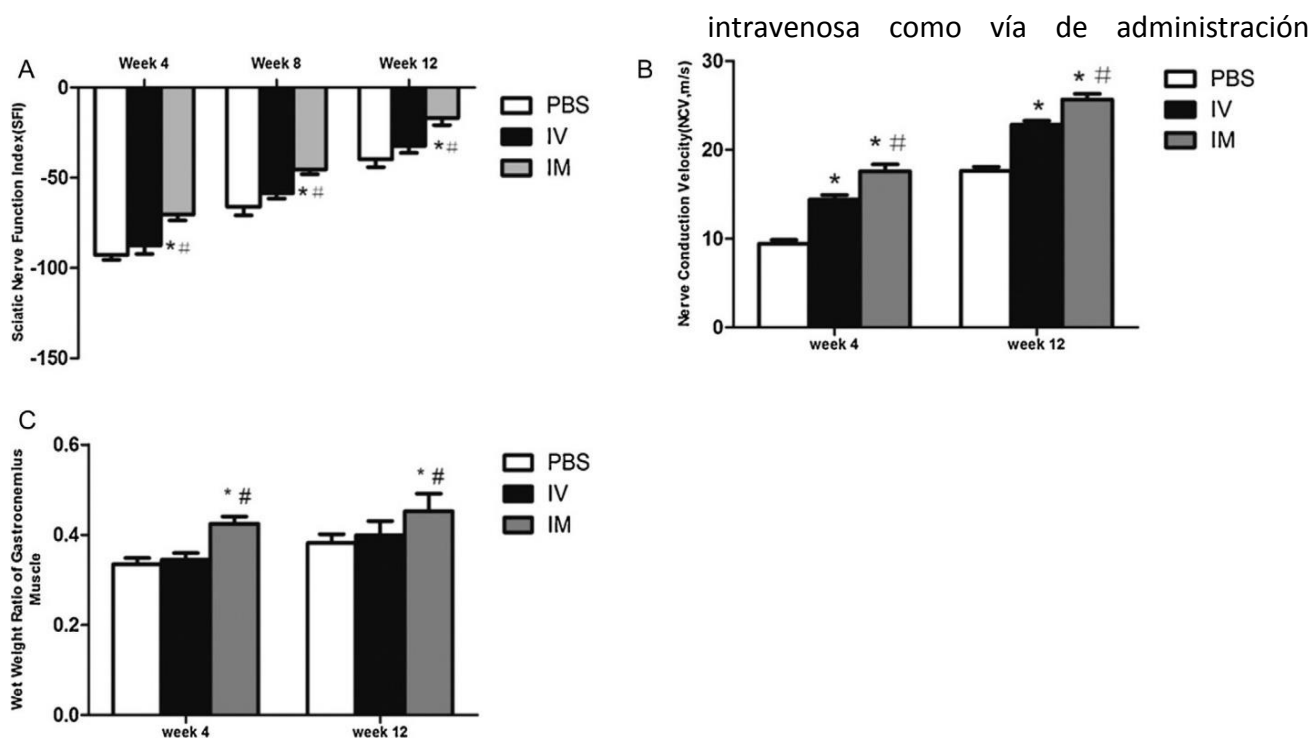


Figura. 2. Análisis cuantitativo del valor SFI de los tres grupos en las semanas 4, 8 y 12 post-neurorrafia (A). NCV Resultados del estudio electrofisiológico (B) y determinación de la tasa de recuperación del peso húmedo del músculo gastrocnemio (C) Tres grupos en las semanas 4 y 12 post-neurorrafia. * $P < 0,05$ vs. grupo PBS, # $p < 0,05$ frente al grupo IV.

4. DISCUSIÓN

Para promover la regeneración nerviosa periférica, recientemente se ha prestado especial atención al trasplante de células madre. Las BMSCs son capaces de diferenciarse a lo largo de múltiples linajes mesenquimales, estas han sido utilizadas en estudios de regeneración de los nervios periféricos y arrojando unos resultados prometedores, a pesar de estos avances, un desafío asociado con este enfoque terapéutico es la vía de administración para una implantación celular eficiente. Originalmente, la implantación local de las BMSC en los nervios lesionados, era la única vía de administración utilizada; sin embargo, la limitación intrínseca de esta vía de administración es el trauma adicional, el cual es necesario para alcanzar el sitio de la inyección. Se ha utilizado la infusión

intravenosa como la vía de entrega de células para un gran número de estudios preclínicos y es la vía de administración de algunos de los primeros ensayos clínicos; sin embargo, se han planteado preguntas acerca de la capacidad para alcanzar un número crítico de células en el área de lesión a través de este enfoque. Schrepfer et al. Informó que el tamaño medio de las BMSC suspendidas, es mayor que el tamaño de los capilares pulmonares en un modelo de rata, debido a su gran tamaño, una gran cantidad de las BMSC inyectadas intravenosamente quedan atrapadas dentro de la zona capilar pulmonar, impidiendo su acceso hacia otros órganos. Toma et al. Demostraron que después de la administración sistémica, la mayoría de las BMSC expandidas en cultivo quedaron atrapadas mecánicamente a nivel precapilar; esto conduce a la reducción significativa del

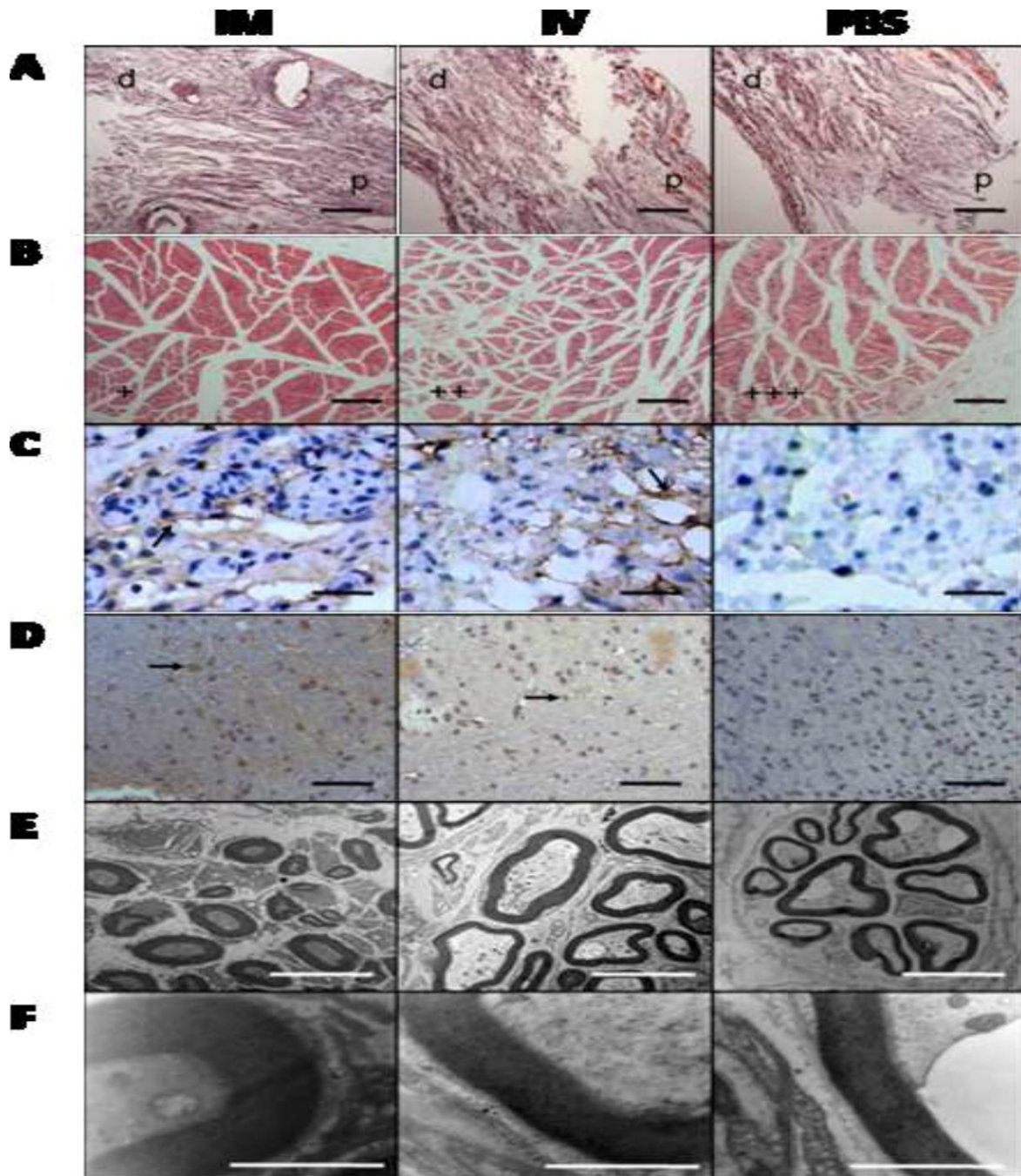


Figura 3. Tinción de HE de los nervios regenerados (A) y del músculo gastrocnemio (B) a las 4 semanas post-neurorrafia; D = lado distal, p = lado proximal, +: atrofia leve, ++: atrofia moderada, +++: atrofia severa. Inmunohistoquímica de BrdU de los nervios regenerados (C) y el lado lesión del cuerno anterior de la médula espinal (D) a las 4 semanas post-neurorrafia. Las flechas indican células inmunopositivas de BrdU. TEM de secciones transversales de los nervios regenerados a las 12 semanas post-neurorrafia (E y F). Barra de escala, A y B = 50 μ m; C y D = 15 μ m; E = 2,5 μ m; F = 500 nm.

flujo, con la muerte generalizada de las BMSCs y algunas células supervivientes inicialmente esparcidas en el lado luminal de los vasos e integrándose en un nicho perivascular. Además, los estudios de Anjos-Afonso et al. demostraron que una respuesta inmune

también podría ser responsable del daño al tejido pulmonar después de la administración intravenosa de BMSC. Los investigadores han demostrado que los factores de crecimiento nervioso, podrían mostrar un transporte retrógrado de los campos nerviosos periféricos

al cuerpo celular, después de la inyección intramuscular, para lograr el objetivo de proteger las neuronas centrales. Otros estudios informaron que la inyección muscular dirigida de factores neurotróficos exógenos, podría conducir a la expresión en las células del cuerno anterior de la médula espinal y prolongar significativamente el tiempo de supervivencia de las ratas en un modelo de esclerosis lateral amiotrófica. Sobre la base de estos resultados, se aplicó la inyección muscular dirigida de BMSC para promover la regeneración nerviosa periférica en un modelo de rata. En este estudio, encontramos que la inyección intramuscular de BMSCs en el músculo gastrocnemio, 1 semana después de la transección del nervio ciático, indujo una aceleración significativa de la recuperación funcional motora y la regeneración axonal. El análisis SFI y el estudio electrofisiológico mostraron que el tratamiento del IM mejoró significativamente el rendimiento motor y aumentó el VCN tres semanas después de la inyección, en comparación con los animales tratados con IV y PBS, y que estas mejoras se mantuvieron hasta el final de los experimentos. Todavía se desconocen los mecanismos subyacentes a la elevación del VCN, un posible mecanismo es que las BMSCs son capaces de migrar a los muñones nerviosos, reemplazando las células dañadas o perdidas, y diferenciándose en células de tipo Schwann y en células gliales después de la inyección intramuscular. El otro posible mecanismo, es que las BMSC podrían liberar factores de crecimiento y citoquinas solubles que podrían exhibir un transporte retrógrado desde el músculo diana a los campos nerviosos lesionados para promover el brote del axón y la mielinización de las fibras. El mecanismo

exacto para esto, podría ser aclarado más adelante en un estudio futuro. El análisis histopatológico confirmó los efectos beneficiosos aportados al tratamiento del IM en términos de crecimiento de la brotación de la fibra, el espesor de la vaina de mielina y la reducción de los infiltrados inflamatorios. Además del análisis inmunohistoquímico, la determinación de la velocidad de recuperación del peso húmedo del músculo gastrocnemio y el análisis microscópico electrónico revelaron mejores resultados en el grupo tratado con IM en comparación con los grupos tratados con IV y tratados con PBS.

5. CONCLUSIÓN

Utilizando una neurorrafia de una pequeña brecha y la unión de la manga del epineuro para reestablecer la continuidad del nervio periférico transectados, así como también, el trasplante de BMSC a través de inyecciones intramusculares, contribuyeron a mejorar perceptiblemente los efectos terapéuticos, promoviendo la regeneración periférica del nervio. Este estudio puede tener importantes implicaciones para el futuro uso terapéutico de las BMSCs y proporcionar las bases para una estrategia en cuanto a la administración intramuscular de las BMSC para promover el crecimiento axonal como un posible medio de tratamiento para la lesión del nervio periférico.

EXPRESIONES DE GRATITUD

Esta investigación fue apoyada por el Departamento de Salud de la provincia de Jiangsu (No. H201414), el Programa de Desarrollo y Planificación de Ciencia y Tecnología de la Ciudad de Suzhou (No.SYS201468) y el Proyecto de Pre-Investigación Científica del Segundo Hospital Afiliado de la Universidad de Soochow.

.SDFEYQN1403). Agradecemos la asistencia técnica del Centro Experimental del Segundo Hospital Afiliado de la Universidad de Soochow.

Referencias

- [1] B. Jiang, P. Zhang, D. Zhang, Z. Fu, X. Yin, H. Zhang, Study on small gap sleeve bridging peripheral nerve injury, *Artif. Cells Blood Substitutes Immobilization Biotechnol.* 34 (2006) 55–74.
- [2] A.S. Barcelos, A.C. Rodrigues, M.D. Silva, C.R. Padovani, Inside-out vein graft and inside-out artery graft in rat sciatic nerve repair, *Microsurgery* 23 (2003) 66–71.
- [3] T.B. Bini, S. Gao, X. Xu, S. Wang, S. Ramakrishna, K.W. Leong, Peripheral nerve regeneration by microbraided poly (l-lactide-co -glycolide) biodegradable polymer fibers, *J. Biomed. Mater. Res. A* 68 (2004) 286–295.
- [4] J.S. Belkas, M.S. Shoichet, R. Midha, Peripheral nerve regeneration through guidance tubes, *Neurol. Res.* 26 (2004) 151–160.
- [5] R. Yavuzer, S. Ayhan, O. Latifoglu, K. Atabay, Turnover epineural sheath tube in primary repair of peripheral nerves, *Ann. Plast. Surg.* 48 (2002) 392–400.
- [6] P. Wang, Z. Zhou, Q. Dong, Small gap anastomosis to repair peripheral nerve rupture using a nerve regeneration chamber constructed by scissoring and sleeve jointing autologous epineurium, *Neural. Regen. Res.* 6 (2011) 623–628.
- [7] G. Keilhoff, A. Goihl, K. Langnase, H. Fansa, G. Wolf, Transdifferentiation of mesenchymal stem cells into Schwann cell-like myelinating cells, *Eur. J. Cell Biol.* 85 (2006) 11–24.
- [8] Y. Liu, Z. Zhang, Y. Qin, H. Wu, Q. Lv, X. Chen, W. Deng, A new method for Schwann-like cell differentiation of adipose derived stem cells, *Neurosci. Lett.* 551 (2013) 79–83.
- [9] U.M. Fischer, M.T. Harting, F. Jimenez, W.O. Monzon-Posadas, H. Xue, S.I. Savitz, G.A. Laine, C.S. Cox Jr., Pulmonary passage is a major obstacle for intravenous stem cell delivery: the pulmonary first-pass effect, *Stem Cells Dev.* 18 (2009) 683–692.
- [10] C. Toma, W.R. Wagner, S. Bowry, A. Schwartz, F. Villanueva, Fate of culture-expanded mesenchymal stem cells in the microvasculature: in vivo observation of cell kinetics, *Circ. Res.* 104 (2009) 398–402.
- [11] S. Marconi, G. Castiglione, E. Turano, G. Bissolotti, S. Angiari, A. Farinazzo, G. Constantin, G. Bedogni, A. Bedogni, B. Bonetti, Human adipose-derived mesenchymal stem cells systemically injected promote peripheral nerve regeneration in the mouse model of sciatic crush, *Tissue Eng. Part A* 18 (2012) 1264–1272.
- [12] J. Gao, J.E. Dennis, R.F. Muzic, M. Lundberg, A.I. Caplan, The dynamic in vivo distribution of bone marrow-derived mesenchymal stem cells after infusion, *Cells Tissues Organs* 169 (2001) 12–20.
- [13] F. Anjos-Afonso, E.K. Siapati, D. Bonnet, In vivo contribution of murine mesenchymal stem cells into multiple cell-types under minimal damage conditions, *Cell Sci.* 117 (2004) 5655–5664.
- [14] Y.Y. Lu, L.J. Wang, S. Muramatsu, K. Ikeguchi, K. Fujimoto, T. Okada, H. Mizukami, T. Matsushita, Y. Hanazono, A. Kume, T. Nagatsu, K. Ozawa, I. Nakano, Intramuscular injection of AAV- GDNF results in sustained expression of transgenic GDNF, and its delivery to spinal motoneurons by retrograde transport, *Neurosci. Res.* 45 (2003) 33–40.
- [15] B.K. Kaspar, J. Llado, N. Sherkat, J.D. Rothstein, F.H. Gage, Retrograde viral delivery of IGF-1 prolongs survival in a mouse ALS model, *Science* 301 (2003) 839–842.
- [16] M. Azzouz, G.S. Ralph, E. Storkebaum, L.E. Walmsley, K.A. Mitrophanous, S.M. Kingsman, P. Carmeliet, N.D. Mazarakis, VEGF delivery with retrogradely transported lentivector prolongs survival in a mouse ALS model, *Nature* 429 (2004) 413–417.
- [17] H. Jia, Y. Wang, X.J. Tong, G.B. Liu, Q. Li, L.X. Zhang, X.H. Sun, Sciatic nerve repair by acellular nerve xenografts implanted with BMSCs in rats xenograft combined with BMSCs, *Synapse* 66 (2011) 256–269.
- [18] J.R. Bain, S.E. Mackinnon, D.A. Hunter, Functional evaluation of complete sciatic, peroneal and posterior tibial nerve lesions in the rat, *Plast. Reconstr. Surg.* 83 (1989) 129–136.
- [19] Y.G. Zhang, Q.S. Sheng, H.K. Wang, L. Lv, J. Zhang, J.M. Chen, H. Xu, Triptolide improves nerve regeneration and functional recovery following crush injury to rat sciatic nerve, *Neurosci. Lett.* 561 (2014) 198–201.
- [20] S.Y. Hou, H.Y. Zhang, D.P. Quan, X.L. Liu, J.K. Zhu, Tissue-engineered peripheral nerve grafting by differentiated bone marrow stroma cells, *Neuroscience* 140 (2006) 101–110.
- [21] E.M. Horwitz, D.J. Prockop, L.A. Fitzpatrick, W.W. Koo, P.L. Gordon, M. Neel, M. Sussman, P. Orchard, J.C. Marx, R.E. Pyritz, M.K. Brenner, Transplantability and therapeutic effects of bone marrow-derived mesenchymal cells in children with osteogenesis imperfecta, *Nat. Med.* 5 (1999) 309–313.
- [22] U. Krause, C. Harter, A. Seckinger, D. Wolf, A. Reinhard, F. Bea, T. Dengler, S. Hardt, A. Ho, H.A. Katus, H. Kuecherer, A. Hansen, Intravenous delivery of autologous mesenchymal stem cells limits infarct size and improves left ventricular function in the infarcted porcine heart, *Stem Cells Dev.* 16 (2007) 31–37.
- [23] S. Schrepfer, T. Deuse, H. Reichenspurner, M.P. Fischbein, R.C. Robbins, M.P. Pelletier, Stem cell transplantation: the lung barrier, *Transplant. Proc.* 39 (2007) 573–576.
- [24] B.J. Baumgartner, H.D. Shine, Permanent rescue of lesioned neonatal motoneurons and enhanced axonal regeneration by adenovirus-mediated expression of glial cell-line-derived neurotrophic factor, *J. Neurosci. Res.* 54 (1998) 766–777.