

Regeneración del nervio ciático axotomizado del perro con prótesis de quitosana precargadas con pregnenolona y la técnica de tubulización

Regeneration of the dog's axotomized sciatic nerve with pregnenolone-saturated chitosan prosthesis implanted through the tubulization technique

Manuel Rosales-Cortés* Jorge Peregrina-Sandoval** Jorge Hernández-Mercado*
Guillermo Nolasco-Rodríguez* María Estela Chávez-Delgado*** Ulises Gómez-Pinedo†
Esther Albarrán-Rodríguez*

Abstract

Peripheral nerves can be injured by traumas or mechanical causes, and thermal, ischemic or tumoral damage, this could present inconveniences of the mobility, sensibility and loss of motor function at the denervated area. The surgical techniques applied to repair nerves have gone through several phases of evolution such as the tubulization technique which consists of a prosthesis with a pipe shape at the segment injured. In this work the biomaterial utilized to manufacture the prosthesis was chitosan, since this compound allows to incorporate to its matrix promoting nervous growing substances that are released *in situ* for a long time while being degraded by titular lysosomes of organic origin. It is known, by diverse studies, that several neurosteroids are involved during the regeneration process of peripheral nerves, which functions are already described, as pregnenolone. In order to determine if there was or not regeneration and the degree of maturity of this, 12 young French Poodle female dogs of 1 to 1.5 years old were used (four were used as intact control group, four were subjected to tubulization technique with chitosan, and four went into tubulization technique with chitosan and pregnenolone neurosteroid, which is a stem hormone), in order to correct 15 mm of axotomized segment. The regenerated nerves were evaluated by means of electronic microscopy of transmission and light, performing cross cuts of 60-70 nm and 1 μ m in thickness for their histological analysis. The morphological findings showed a similar structure to that of an intact nerve, since the number of myelinated axons, not myelinated and the proportion "g" (which indicates the ripening degree of the axon), were similar, indicating that the regeneration of the axotomized nerves and tubulization was achieved, independently of the administered treatment.

Key words: BIOMATERIAL, CHITOSAN, AXOTOMIZED SCIATIC NERVE, REGENERATION, PERIPHERAL NERVES AND PREGNENOLONE.

Resumen

Los nervios periféricos se pueden lesionar por traumatismos o causas mecánicas, térmicas, daño isquémico o tumoral, pudiendo presentar trastornos de la movilidad, sensibilidad y pérdida de la función motora en el área denervada. Las técnicas quirúrgicas aplicadas en la reparación nerviosa han pasado a través de varias etapas de evolución, como la técnica de tubulización, que consiste en usar una prótesis en forma de tubo en el segmento lesionado. En este trabajo se utilizó el biomaterial quitosana para fabricar las prótesis, ya que permite incorporar a su matriz sustancias promotoras del crecimiento nervioso que se liberan de forma prolongada *in situ* al ser degradado por lisosomas titulares por ser de origen orgánico. Se sabe, por diversos estudios, que en el proceso de regeneración participan diversos neuroesteroides en nervios periféricos, cuyas funciones están ya descritas, como la pregnenolona. Para determinar si había o no regeneración y el grado de madurez de ésta, se utilizaron 12 hembras, adultas jóvenes, de la raza French Poodle, de entre 1 y 1.5 años de edad (cuatro se utilizaron como grupo testigo intacto, cuatro fueron tubulizadas con quitosana, y cuatro se tubulizaron con quitosana y el neuroesteroide pregnenolona, que es una hormona

Recibido el 25 de enero de 2006 y aceptado el 22 de agosto de 2007.

*Laboratorio de Morfofisiología, Departamento de Medicina Veterinaria, División de Ciencias Veterinarias, Centro Universitario de Ciencias Biológicas Agropecuarias, Universidad de Guadalajara Km. 15.5, Carretera Guadalajara-Nogales, predio Las Agujas, Zapopan, Jalisco, México.

**Laboratorio de Inmunología, Departamento de Biología Molecular, División de Ciencias Biológicas y Ambientales, Centro Universitario de Ciencias Biológicas Agropecuarias, Universidad de Guadalajara Km. 15.5, Carretera Guadalajara-Nogales, predio Las Agujas, Zapopan, Jalisco, México.

***Departamento de Otorrinolaringología del Hospital General de Zona 89, Instituto Mexicano del Seguro Social, Guadalajara, Jalisco, México.

†División de Patología y Biotecnología Ambiental, Centro de Investigación y Asistencia en Tecnología y Diseño del estado de Jalisco, A. C. y Laboratorio de Patología Clínica, OPD, Antiguo Hospital Civil de Guadalajara, Guadalajara, Jalisco, México.

Correspondencia: Manuel Rosales Cortés, Centro Universitario de Ciencias Biológicas y Agropecuarias, Universidad de Guadalajara, Kilómetro 15.5, Carretera Guadalajara-Nogales, predio Las Agujas, Zapopan, Jalisco, 45110, México, Tel. (+52-33) 3682-0918, Fax (+52-33) 3682-0918, Correo electrónico: mrosales@cucba.udg.mx

madre), para corregir un segmento de 15 mm que fue axotomizado. Los nervios regenerados se evaluaron mediante microscopía electrónica de transmisión y de luz, efectuando cortes transversales de 60-70 nm y 1 µm de espesor, para su análisis histológico. Los hallazgos morfológicos evidenciaron una estructura similar a la de un nervio intacto, ya que el número de axones mielinizados, no mielinizados y la proporción "g" (que indica el grado de maduración del axón) fueron semejantes, lo que indica que la regeneración de los nervios axotomizados y tubulizados se logró, independientemente del tratamiento aplicado.

Palabras clave: BIOMATERIAL, QUITOSANA, REPARACIÓN DEL NERVIPO CIÁTICO, REGENERACIÓN, NERVIOS PERIFÉRICOS Y PREGNENOLONA.

Introduction

A peripheral nerve is constituted by nervous fibers (axons) that can vary in size and caliber, be myelinated or amyelinic, and its function is to transmit impulses in afferent or efferent direction of the central nervous system. Peripheral nerves are frequently known as mixed nerves because they are constituted by sensitive and motor fibers. The nerve's structural organization changes throughout its length because of the repetitive division and union of different nervous fasciculus, producing complex fascicular formations. A peripheral nerve can be constituted by thousands of axons, but its number of them in each peripheral nerve is variable.¹

The spinal cord, that goes through the spinal canal, emits between 36 and 37 spinal nerve pairs that emerge from the canal through the intervertebral holes distributed at the cervical, thoracic, lumbar and sacral regions. From the ventral branches of the last lumbar nerves and first sacral nerves, the lumbosacral nervous plexus is formed, which innervates all the pelvic limb by the following nerves: from the inside face of the thigh emerges the femoral nerve, which innervates in a motor and sensitive way the internal rectus muscle, pectineus abducens, and from the major sciatic notch appears the sciatic nerve, which innervates the external face of the thigh, formed by the semitendinosus, semimembranosus muscles and external vastus of the femoral quadriceps. The sciatic nerve goes in direction to the limb's knee and bifurcates, propitiating two nerves: tibial and peroneal; the first gives origin to digital nerves and from the second the popliteal and saphenous nerves detach.^{2,3}

The axon's transection (axotomy) represents a powerful paradigm to study cellular death and regeneration in neurons. Depending on the lesion's site, the axonal damage allows neurons to regenerate their axons, reestablish their functional contact with the target cells, or initiate a complex process that leads to neural death.⁴

It is known that axonal degeneration is important cause of morbidity, and that pathogenic mechanisms have not been identified yet.^{5,6} Damage of a peripheral nerve in mammals induces a complex but reproducible sequence of histopathological events. After a nerve's section, the first response takes place in the distal end of the nervous fibers, this phenomenon is called anterograde degeneration (wallerian degeneration);⁷⁻¹¹ then, in the proximal fibers of the lesion, the phenomenon known as retrograde neuronal

Introducción

Un nervio periférico está compuesto de fibras nerviosas (axones) que pueden variar en tamaño y calibre, ser mielínicas o amielínicas, y su función es transmitir impulsos en dirección aferente o eferente al sistema nervioso central. Los nervios periféricos a menudo se refieren como nervios mixtos porque están compuestos tanto de fibras sensitivas como de fibras motoras. La organización estructural del nervio cambia a lo largo de él por la repetida división y unión de diferentes fascículos nerviosos, produciendo formaciones fasciculares complejas. Un nervio periférico puede estar compuesto de miles de axones, pero el número de ellos en cada nervio periférico es variable.¹

La médula espinal, que pasa por el canal intervertebral, emite entre 36 y 37 pares de nervios espinales que emergen del canal por los agujeros intervertebrales distribuidos en las regiones cervical, torácica, lumbar y sacra. De las ramas ventrales de los últimos nervios lumbares y los primeros nervios sacros, se forma el plexo nervioso lumbosacro, que inerva a todo el miembro pelviano mediante los siguientes nervios: por la cara interna del muslo emerge el nervio femoral, que inerva motora y sensitivamente al músculo recto interno, pectíneo abducens, y por la escotadura ciática mayor aparece el nervio ciático, que da inervación a la cara externa del muslo, que está formado por los músculos semitendinoso, semimembranoso y vasto externo del cuádriceps femoral. El nervio ciático se dirige hacia la rodilla del miembro y se bifurca, propiciando dos nervios: tibial y peroneo; el primero da origen a los nervios digitales y del segundo se desprenden los nervios popíteleo y safeno.^{2,3}

La transección del axón (axotomía) representa un paradigma poderoso para estudiar la regeneración y muerte celular en neuronas. En función del sitio donde se lleva a cabo la lesión, el daño axonal permite que las neuronas regeneren sus axones, restablezcan su contacto funcional con sus células diana, o que dé inicio a un proceso complejo que lleve a la muerte neuronal.⁴

Se reconoce que la degeneración axonal es causa importante de morbilidad, y que los mecanismos patogénicos aún no han sido bien identificados.^{5,6} El daño de un nervio periférico en mamíferos induce a

degeneration is manifested;^{12,13} in the cellular soma progressive degenerative changes take place leading to neuronal death.^{13,14}

Peripheral nerves' capacity to regenerate contrasts with the inability of the central nervous system. This regenerative ability of the peripheral nervous system has been attributed to the microenvironment which Schwann cells of the distal nervous stump provide. Despite of the regenerative capacity, functional recovery of a damaged peripheral nerve is still disappointing, even after immediate microsurgery is performed to repair the nerve. Clinical experience has established that functional recovery is particularly bad for major nerves' damage, as the ones that emerge from the lumbar plexus, since they need to travel long distances to reestablish connections with their target cells, which have been denervated by damage. Slow rhythm regeneration, 1-3 mm/day, may take months or even years.^{15,16}

Several authors have reported the participation of the endocrine system in neural repair, demonstrating that the substances ACTH, T3, T4 and testosterone¹⁷⁻²⁰ increase nervous regeneration. Likewise, it is known that central and peripheral nervous systems have the capacity to synthesize some steroids (neurosteroids), among them pregnenolone, a precursor hormone from which other steroids are formed that are also present during the regeneration of a damaged nerve.^{21,22}

Neurosteroids are synthesized in central nervous tissue and peripheral nerves, independently of the steroidogenic glandular activity. They are formed from cholesterol collateral chains by participation of cytochrome enzyme P 450 scc in the internal membranes of the mitochondria, that convert cholesterol into pregnenolone and this originates progesterone, main female gonadal hormone.²³

High concentrations of pregnenolone that are detected in human sciatic nerve confirm the synthesis of this compound in peripheral nerves.²⁴ Later, in rat's sciatic nerve, pregnenolone concentrations ten times greater than in plasma (10 ng/g) were registered.²⁵

Among pregnenolone functions that support nervous regeneration it is known that it stimulates the growth of neurites in sensorial neurons of the dorsal ganglionic root, that accelerates growth of the regenerated axons of damaged nerves and stimulates myelination of regenerated nervous fibers.^{22,26}

The regeneration functionality of peripheral nerves depends on interactions between axons in regeneration, non neuronal cells, growth factors and its receptors, adhesion cellular molecules, and extra cellular matrix materials.¹² The regeneration of the peripheral nerve involves the formation of axonal sprouts, projection of the regenerated axon and finally, reinnervation of target tissue (terminal plate formation);^{27,28} nevertheless, the factors which control regeneration of peripheral nerves are unknown.^{17,29}

Weiss¹⁴ introduces tubulization as an alternative to repair and regenerate sectioned peripheral nerves in which segments are lost, that are substituted by tube-

una compleja pero reproducible secuencia de eventos histopatológicos. Después de la sección de un nervio, la primera respuesta sucede en el extremo distal de las fibras nerviosas, este fenómeno se denomina degeneración anterógrada (degeneración walleriana);⁷⁻¹¹ luego se manifiesta, en las fibras proximales de la lesión, el fenómeno conocido como degeneración neuronal retrógrada;^{12,13} en el soma celular suceden cambios degenerativos progresivos que llevan a la muerte neuronal.^{13,14}

La capacidad de los nervios periféricos para regenerar contrasta con la inhabilidad del sistema nervioso central. Esta habilidad regenerativa del sistema nervioso periférico ha sido atribuida al microambiente que proveen las células de Schwann del muñón nervioso distal. A pesar de la capacidad regenerativa, la recuperación funcional de un nervio periférico dañado es aún decepcionante, incluso después de aplicar inmediatamente la microcirugía para reparar el nervio. La experiencia clínica ha establecido que la recuperación funcional es particularmente mala para daños en nervios grandes, como los que surgen del plexo lumbar, ya que necesitan recorrer grandes distancias para restablecer conexiones con sus células diana, las cuales han sido denervadas por el daño. El ritmo lento de regeneración, 1-3 mm/día, puede llevar meses o incluso años.^{15,16}

Diversos autores han informado sobre la participación del sistema endocrino en la reparación neural, demostrando que las sustancias ACTH, T3, T4 y testosterona¹⁷⁻²⁰ incrementan la regeneración nerviosa. Asimismo, se sabe que los sistemas nervioso central y periférico presentan la capacidad de sintetizar algunos esteroides (neuroesteroides), entre ellos la pregnenolona, hormona madre de la cual se forman otros esteroides que también se hallan durante la regeneración de un nervio lesionado.^{21,22}

Los neuroesteroides se sintetizan en tejido nervioso central y en nervios periféricos, independientemente de la actividad glandular esteroidogénica. Se forman a partir de las cadenas colaterales del colesterol mediante la participación de la enzima citocromo P450scc en las membranas internas de las mitocondrias, que convierten el colesterol en pregnenolona y ésta da origen a la progesterona, principal hormona gonadal femenina.^{22,23}

Las elevadas concentraciones de pregnenolona que se detectan en el nervio ciático del humano confirman la síntesis de este compuesto en nervios periféricos.²⁴ Después, en el nervio ciático de la rata, se registraron concentraciones de pregnenolona diez veces mayor que en el plasma (10 ng/g).²⁵

Entre las funciones de la pregnenolona que apoyan a la regeneración nerviosa se encuentra que estimula el crecimiento de neuritas en las neuronas sensoriales

shape prosthesis, to allow concentration of axoplasmic exudates which contain neurotropic and mitogenic factors necessary to induce nerve growth, besides allowing axonal sprouting orientation.

In the nervous lesions in which a sectioned nerve was tubulized, the first necessary event for nervous regeneration was the formation of a fibrinoid acellular matrix between both segments, this acts as a bridge for axonal growth and allows migration of non neuronal cells and axonal growth,^{30,31} later, fibronectin and laminin appears, glucoproteins present in basal lamina, with important effects on axonal growth.³⁰ *In vitro* experiments revealed the participation of collagen type I and IV, fibronectin and laminin, in neurites adhesion to substrate; likewise, by Schwann nervous cell cultures and fibroblasts, the importance of a basal membrane to accomplish a successful axonal regeneration is evident.³²

Due to the lack of adequate materials to fabricate useful prostheses for nerve repair, researchers have looked for new alternatives and, now, organic materials are being used that allow their biodegradation and bioabsorption by the organism, avoiding a second surgery for their removal, as it used to happen with silicon prostheses. It has been tested with diverse biomaterials, such as: gortex,³³ millipore,³⁴ surgicel,⁹ collagen,^{35,36} polyglycolic acid³⁷ and endogenous materials, such as: dura mater, vein and basal membrane components.^{26,33}

The present study is based on the combination of two very important elements: on one side, the use of pregnenolone neurosteroid as neurotropic factor, preloaded in the matrix of a biomaterial called chitosan, that comes from the chitin that is present in the stem of several plants, mushrooms, insects, mollusk and in the shell of some invertebrates.^{38,39} Chitin is an homopolymer of lineal structure with beta links (1-4)-2- amino- desoxy-D-glucose (or glucosamide),^{39,41} it is obtained in different physical presentations (solution, flakes, powder, drops, fibers, among others); its solubility depends on the pH, because it is not water soluble, organic solvents and alkaline solutions, but it is hydrosoluble in acid mediums,^{8,38,39,42} it is biodegradable and bioabsorbable in 75% by chitosan enzymes and in 35% by titter lysoenzymes,^{40,43,44} it has a percentage of deacetylation > 74%, with low toxicity, hydrophilic affinity, stability in the presence of putrefaction and pliable.^{8,45} Chitosan offers the advantages to allow local liberation and lengthening of compounds while acting as vehicle because it allows incorporation of substances in its matrix, promoters of nervous growth, as pregnenolone, which is the second element that was used in this work for its beneficial qualities in the regeneration process, avoiding undesired collateral effects on a systemic treatment.^{22,46}

From different studies done on rodent axotomized-tubulized nerves, it has been noted that regeneration success depends fundamentally on diverse factors:^{47,48} variations in the tube diameter,⁴⁹ the distance between nerve segments (10 mm/15 mm),^{49,50} the use of

de la raíz dorsal ganglionar, que acelera la maduración de axones regenerados de nervios lesionados y estimula la remielinización de fibras nerviosas regeneradas.^{22,26}

La funcionalidad de la regeneración de nervios periféricos depende de interacciones entre axones en regeneración, células no neuronales, factores de crecimiento y sus receptores, moléculas celulares de adhesión y materiales de la matriz extracelular.¹² La regeneración del nervio periférico comprende la formación de brotes axónicos, proyección del axón regenerado y, finalmente, la reinervación al tejido diana (formación de placa terminal);^{27,28} sin embargo, se desconocen los factores que controlan la regeneración de nervios periféricos.^{17,29}

Weiss¹⁴ introduce la técnica de tubulización como alternativa para reparar y regenerar nervios periféricos seccionados en los que se pierden segmentos, que se sustituyen con prótesis en forma de tubo, para permitir la concentración de los exudados axoplasmáticos que contienen los factores neurotróficos y mitogénicos necesarios para inducir el crecimiento del nervio, además de permitir la orientación de rebrote axónico.

En las lesiones nerviosas en que se tubulizó un nervio seccionado, el primer evento necesario para la regeneración nerviosa fue la formación de una matriz acelular fibrinoide entre ambos segmentos, ésta actúa como puente para el crecimiento axonal y permite la migración de células no neuronales y el crecimiento axonal;^{30,31} más tarde, aparece la fibronectina y laminina, glucoproteínas presentes en lámina basal, con efectos importantes sobre el crecimiento axonal.³⁰ Experimentos *in vitro* revelaron la participación de colágena tipos I y IV, fibronectina y laminina, en la adhesión de neuritas al sustrato; asimismo, mediante cultivos de células nerviosas de Schwann y fibroblastos, se evidencia la importancia de una membrana basal para lograr la regeneración axonal exitosa.³²

Debido a la falta de materiales adecuados para fabricar prótesis útiles en la reparación de nervios, los investigadores han buscado nuevas alternativas y ahora se están usando materiales orgánicos que permiten su biodegradación y bioabsorción por parte del organismo, evitando con ello una segunda cirugía para retirarlos, como sucedía con las prótesis de silicona. Se ha estado ensayando con diversos biomateriales como el gortex,³³ millipore³⁴ surgicel,⁹ colágena,^{35,36} ácido poliglicólico³⁷ y materiales endógenos, como duramadre, vena y componentes de membrana basal.^{26,33}

El presente trabajo se basa en la combinación de dos elementos muy importantes: por un lado, el uso del neuroesteroide pregnenolona como factor neurotrófico, precargado en la matriz de un biomaterial lla-

different tropic substances as nerve growth factor and prosthesis grafts manufactured with synthetic materials or biomaterials, and the nature of the nervous traumatism.⁵¹

The present study evaluated the pregnenolone effect on the regeneration of a dog's sciatic nerve segment, of 15 mm of length, axotomized and tubulized by means of a chitosan prosthesis.

Material and methods

Twelve adult, young, French Poodle females, 1.5 years old and 7 ± 2 kg, lodged and maintained in biotery conditions with *ad libitum* feeding.

A control group was formed that was only axotomized, another that was also axotomized and tubulized with chitosan prosthesis and one that was axotomized and tubulized with chitosan prosthesis and 50 mg of pregnenolone pre-loaded in its matrix, all of them with $n = 4$ animals per group. Regeneration was induced with 15 mm error. Promazine chlorhydrate was administered,* 25 mg/kg weight/IM as pre-anesthetic and sodium pentobarbital,* 40 mg/kg weight/IV as anesthetic to practice sciatic nerve axotomy and axotomy-tubulization for the programmed animals.

Animals were euthanized at 60 days post-lesion and the segments of the regenerated nerves were obtained in order to perform macroscopic and morphometric tests, with the finality to determine the degree of regeneration and maturity. The number of amyelinic, myelinated and "g" proportion axons was quantified, which is obtained by dividing the total area of the fiber between the internal axoplasm or internal area that indicates the degree of axon maturity and it is inversely proportional, that is, the greater the surface occupied by myelin, the lesser "g" proportion, and the more myelin, the greater maturity degree.²⁸

From each nervous segment, 1 mm thick longitudinal fragments were obtained, dehydrated by changes in increasing series of ethanol** and acetone*** pre-included in mixes of solvent and epoxic resins;† finally, tissues were included in resins utilizing capsules.‡ One μm thick transversal cuts were done in an ultramicrotome,° they were stained with toluidine blue°° for morphometric analysis.

With the purpose to evaluate the present cellular population and the organization of its tissue components of the regenerated segment, previously included tissues also in resin were used, with 60-70 nm thick fine cuts in an ultramicrotome (silver to golden range of the visible light diffraction spectrum). Three cuts per screen and six per animal were fixed, contrasting with a uranyl acetate solution°°° and lead citrate,^ in a saturated atmosphere with NaOH to measure its pre-

mado quitosana, que proviene de la quitina que está presente en el tallo de varias plantas, hongos, insectos, moluscos y en el caparazón de algunos invertebrados.^{38,39} La quitina es un homopolímero de estructura lineal con enlaces beta (1-4)-2- amino- desoxy-D-glucosa (o glucosamina),³⁹⁻⁴¹ se obtiene en diferentes presentaciones físicas (solución, hojuelas, polvo, gotas, fibras, entre otras); su solubilidad depende del pH, pues se muestra insoluble en agua, solventes orgánicos y soluciones alcalinas, pero es hidrosoluble en medios ácidos,^{8,38,39,42} es biodegradable y bioabsorbible en 75% por las enzimas quitosanas y en 35% por las lisoenzimas titulares,^{40,43,44} tiene un porcentaje de desacetilación >74%, con baja toxicidad, afinidad hidrofílica, estabilidad ante la putrefacción y modelable.^{8,45} La quitosana ofrece las ventajas de permitir la liberación local y prolongada de compuestos al actuar como vehículo porque permite la incorporación de sustancias a su matriz, promotoras del crecimiento nervioso, como la pregnenolona, que es el segundo elemento que se utilizó en este trabajo por sus cualidades benéficas en el proceso de regeneración, al evitar efectos colaterales indeseables en un tratamiento sistémico.^{22,46}

A partir de distintos estudios con nervios axotomizados-tubulizados de roedores, se ha evidenciado que el éxito de la regeneración depende fundamentalmente de diversos factores:^{47,48} las variaciones en el diámetro del tubo,⁴⁹ la distancia entre los segmentos del nervio (10 mm/15 mm),^{49,50} el uso de diferentes sustancias tróficas como el NGF e implantes de prótesis elaboradas con materiales sintéticos o biomateriales, y la naturaleza del traumatismo nervioso.⁵¹

En el presente trabajo se evaluó el efecto de la pregnenolona en la regeneración de un segmento del nervio ciático de perro, de 15 mm de longitud, axotomizado y tubulizado mediante el uso de una prótesis de quitosana.

Material y métodos

Se utilizaron 12 hembras French Poodle, adultas, jóvenes, de 1.5 años de edad y de 7 ± 2 kg, alojadas y mantenidas en condiciones de bioterio con alimentación *ad libitum*.

Se formó un grupo testigo que sólo fue axotomizado, otro que también fue axotomizado y tubulizado con prótesis de quitosana y uno que fue axotomizado y tubulizado con prótesis de quitosana y 50 mg de pregnenolona precargada en su matriz, todos con $n = 4$ animales por grupo. La regeneración fue inducida en un defecto de 15 mm. Se les aplicó clorhidrato de promazina,* 25 mg/kg peso/IM como preanesté-

*Promece, Fort Dodge Animal Health, Estados Unidos de América.

precipitation. Cuts were examined with electronic microscope^{^^} and film negatives of 63 × 88 mm to 3 000 X in random fields of a visual field surface of 368 μm² were obtained. With comparative purposes, the intact undamaged nerve was taken as control; thus, on base of the morphological characteristics, cellular and non cellular elements were identified which are present in the regeneration process, such as collagen or elastin fibers, fibroblasts, myelinated and amyelinic axons in different maturation stages.

The statistic analysis was done from the morphometric analysis results, and from each animal both stumps, proximal and distal, were checked, quantifying the number of myelinated and amyelinic axons, and the "g" proportion. The obtained values were compared to the results of the undamaged control nervous segment; afterwards, the ANOVA statistic analysis was performed, followed by a Tukey test at a significant level of 0.05.

Results

After axotomy, all animals presented the damaged limb flexed towards the abdomen, but 15 days after the lesion, the animals that were tubulized started to rest the limb and walk with a mild lameness, that disappeared 30 days after, this did not occur with those that were only axotomized.

All animals were euthanized at 60 days post-lesion, the muscles that cover the sciatic nerve were separated and it was observed that the prostheses had completely disappeared, proving that they had been biodegraded and absorbed by the organism; in its place there were reconnected nervous stumps with 15 mm in length and with a caliber and structure similar to the control one (Figure 1).

Macroscopic findings of the females that were axotomized and tubulized with chitosan prostheses with or without neurosteroid pre-loaded in their matrix were compared to the female control group that were only axotomized but not tubulized, it was observed that the nervous stumps that were in place on the axotomy were reabsorbed and disappeared completely; that is, anterograde and retrograde degeneration of the distal and proximal stump was present.

In the structural analysis with electronic transmission microscopy of transmission of the tubulized group with chitosan, without neurosteroids, myelinated and amyelinic axons of different sizes, cells with diverse morphology and myelin sheaths with variable thickness, of compact aspect and spheroid-shape distributed in the cut, as well as Schwann cells in different grade of maturity were observed. In the group of chitosan with pregnenolone there were the same regeneration stages as the one of chitosan. The

sico y pentobarbital sódico,* 40 mg/kg peso/IV como anestésico para practicarles la axotomía del nervio ciático y axotomía-tubulización para los animales programados.

Los animales se sacrificaron a los 60 días poslesión y se obtuvieron los segmentos de nervios regenerados para aplicarles exámenes macroscópico y morfométrico, con el fin de determinar el grado de regeneración y madurez. Se cuantificó el número de axones no mielinizados, mielinizados y la proporción "g", que se obtiene dividiendo el área total de la fibra entre el axoplasma interno o área interna que indica el grado de madurez del axón y que es inversamente proporcional, o sea, a mayor superficie ocupada por mielina, menor proporción "g", y entre más mielina, mayor grado de madurez.²⁸

A partir de cada segmento nervioso se obtuvieron fragmentos longitudinales de 1 mm de espesor, que fueron deshidratados mediante cambios en series crecientes de etanol** y acetona*** preincludidos en mezclas de solvente y resinas epóxicas,† finalmente los tejidos se incluyeron en resinas utilizando cápsulas.‡ Se realizaron cortes transversales de 1 μm de espesor en un ultramicrotomo,° se tiñeron con azul de toluidina°° para el análisis morfométrico.

Con el propósito de valorar la población celular presente y la organización de sus componentes tisulares del segmento regenerado, se destinaron tejidos previamente incluidos también en resina, con cortes finos de 60-70 nm de espesor en un ultramicrotomo (rango dorado a plateado del espectro de difracción de luz visible). Se montaron tres cortes por rejilla y seis por animal, contrastándose con una solución de acetato de uranilo°°° y citrato de plomo,^ en una atmósfera saturada con NaOH para medir su precipitación. Los cortes se examinaron con microscopio electrónico^^ y se obtuvieron negativos en película de 63 × 88 mm a 3 000 X en campos aleatorios de una superficie por campo visual de 368 μm². Con fines de comparación, se tomó como testigo el nervio intacto no lesionado; así, con base en las características morfológicas se identificaron elementos celulares y no celulares que están presentes en el proceso de regeneración, como fibras de colágena o elastina, fibroblastos, axones mielinizados y no mielinizados en diferente estadio de maduración.

*Anestesal, Pfizer, México.

**Sigma R 8382, Estados Unidos de América.

***Aldrich, clave 67-64-1, Estados Unidos de América.

† SPI Chem 02660 AB, Estados Unidos de América.

‡Been, 16659-1 Polysciences Laboratorios, Inc Warrington Balleyroad, Estados Unidos de América.

°Sorvall, Equipar, S A de C V, México.

°°Sigma T 0394, clave 92319, Estados Unidos de América.

°°°Segulab, Estados Unidos de América.

^Spi-Chem, Weschester, Estados Unidos de América.

^^JEOL, Bid-Service LLC, Estados Unidos de América.

spaces that divide a normal nerve were found, as the epineurium, perineurium and endoneurium, formed by a large quantity of collagen and elastin fibers of fibroconnective tissue that wrap and support cellular components and nervous fibers (Figure 2 and 3).

Morphometric analysis

The statistic analysis indicated that there were no significant differences ($F, 4, 25 = 0.18, P > 0.05$) on the number of myelinated fibers among the experimental groups, in relation to an intact undamaged nerve (Table 1).

The amyelinic axons' analysis of the regenerated nerves did not indicate significant differences ($F, 4, 45 = 0.98, P > 0.05$) among the experimental groups, in relation to the number of amyelinic fibers of an intact nerve (Table 2).

The "g" proportion's analysis of the myelinated axons indicated that there were no significant differences among the treatments, in relation to the control group ($F, 5, 45 = 0.64, P > 0.05$). Nevertheless, it should be noted that again the chitosan group followed by pregnenolone showed less proportion, which demonstrates that the axons of these groups have greater thickness of myelin; therefore, present better regeneration (Table 3).

Discussion

The recovery of the surgical wound in all animals was attained after ten days post-lesion and little by little the females that were axotomized and tubulized recovered motor and sensitive function of the damaged limb, that proved effectiveness of the tubulization technique, because it allowed the concentration of tropic factors and the axonal reconnection, avoiding its degeneration.^{14,35,37} As consequence of that, nerves totally regenerated according to the observed macro-

El análisis estadístico se realizó a partir de los resultados del análisis morfométrico, y de cada animal se revisaron ambos muñones, proximal y distal, cuantificando el número de axones mielinizados y no mielinizados, y la proporción "g". Los valores obtenidos se compararon con los resultantes del segmento nervioso del testigo no lesionado y posteriormente se les aplicó el análisis estadístico ANDEVA, seguido de una prueba de Tukey a un nivel de significancia de 0.05.

Resultados

Después de la axotomía, todos los animales presentaron el miembro lesionado recogido hacia el vientre, pero a los 15 días de la lesión, los animales que fueron tubulizados empezaron a apoyarlo y a caminar con ligera claudicación, que desapareció al cabo de 30 días, esto no ocurrió con los que sólo se axotomizaron.

Todos los animales se sacrificaron a los 60 días pos-lesión, se separaron los músculos que cubren al ciático y se observó que las prótesis habían desaparecido por completo, comprobando que fueron biodegradadas y absorbidas por el organismo; en su lugar se encontraron muñones nerviosos reconectados de 15 mm de longitud y con un calibre y estructura semejante al del testigo (Figura 1).

Se compararon los hallazgos macroscópicos de las hembras que fueron axotomizadas y tubulizadas con prótesis de quitosana con o sin neuroesteroide precargado en su matriz, contra las hembras del grupo testigo que sólo fueron axotomizadas pero no tubulizadas, se observó que los muñones de nervio que quedaron en el lugar de la axotomía fueron reabsorbidos y desaparecieron por completo; o sea, se presentó degeneración anterógrada y retrógrada del muñón distal y proximal.

En el análisis estructural con microscopía electrónica de transmisión del grupo tubulizado con qui-

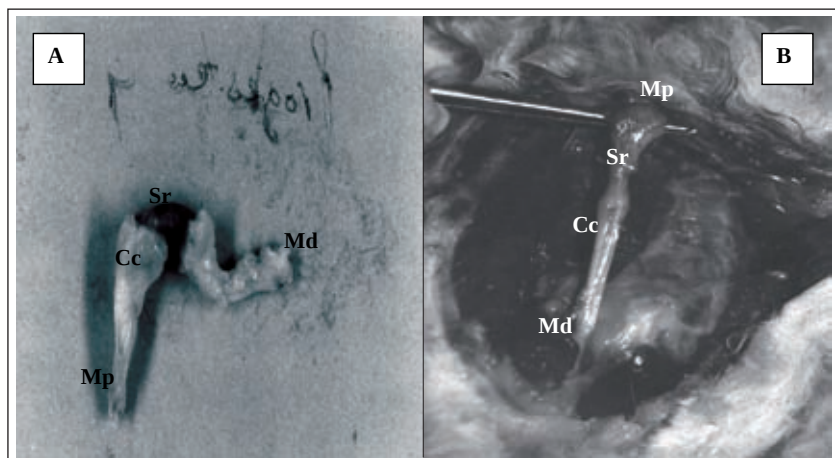


Figura 1: En la imagen A se observa el nervio regenerado de una hembra que fue axotomizada y tubulizada con prótesis de quitosana sin pregnenolona y en la imagen B se aprecia un nervio de las hembras del grupo que fue axotomizado y tubulizado con prótesis de quitosana con el neuroesteroide pregnenolona precargado en su matriz, en ambos se muestra los cono de crecimiento = Cc, el segmento regenerado = Sr, el muñón Proximal = Mp y el distal = Md.

Figure 1: In image A a regenerated nerve is observed from a female that was axotomized and tubulized with chitosan prosthesis without pregnenolone, and in image B it is observed a nerve from the female group that was axotomized and tubulized with chitosan prosthesis with neurosteroid pregnenolone preloaded in its matrix, both show growth cones = Cc, regenerated segment = Rs, proximal stump = Ps and distal = Ds.

scopic and microscopic findings, which coincides with other authors.^{19,35,47}

According to the results, chitosan, for its special properties, as low toxicity, cationic, biodegradable, antimicrobial and hypoallergenic, allowed to show its usefulness on nerve reparation with similar calibers to those of human, since ten days after post-lesion, females that were axotomized and tubulized with or without pregnenolone, recovered motor and sensitive function of the damaged limb.^{14,35,37} Due to these factors, nerves totally regenerated according to the observed macroscopic and microscopic findings.^{19,35,47}

Although regeneration was originated no matter treatment in tubulized females, it was proven that chitosan biomaterial functions to administer *in situ* treatments, avoiding the effects of systemic treatments, as well as a second surgery to remove the prosthesis, as it happens with other materials, since it allowed to be slowly degraded during the 60 days study, assuring with this the prolonged liberation of the neurosteroid pregnenolone that was pre-loaded in its matrix.³⁹

The microscopic findings of the nerve regeneration were verified with light and electronic transmission microscopy, which determined that it was in an advanced and mature stage. The reconnection of the axotomized and tubulized nerves was present with or

tosana, sin neuroesteroides, se observaron axones mielinizados y no mielinizados de diferente diámetro, células con morfología diversa y vainas de mielina con espesor variable, de aspecto compacto y formas esféricas distribuidas en el corte, así como células de Schwann en diferente grado de maduración. En el grupo de quitosana con pregnenolona se distinguieron los mismos estadios de regeneración que el de quitosana. Se encontraron los espaciamentos que dividen a un nervio normal, como el epineuro, perineuro y endoneuro, formados por una gran cantidad de fibras de colágena elastina a manera de tejido fibroconectivo que envuelven y soportan los componentes celulares y a las fibras nerviosas (Figuras 2 y 3).

Análisis morfométrico

El análisis estadístico indicó que no hubo diferencias significativas ($F, 4, 25 = 0.18, P > 0.05$) del número de fibras mielinizadas entre los grupos experimentales con respecto a un nervio intacto no lesionado (Cuadro 1).

El análisis de axones no mielinizados de los nervios regenerados no indicaron diferencias significativas ($F, 4, 45 = 0.98, P > 0.05$) entre los grupos experimentales, en relación con el número de fibras no mielinizadas de un nervio intacto (Cuadro 2).

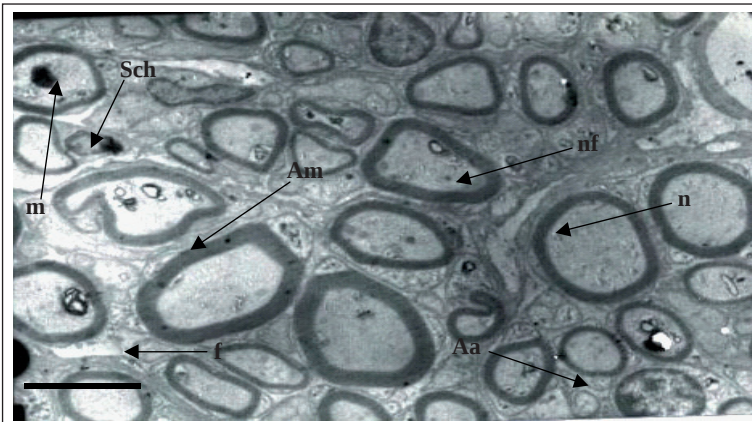


Figura 2: Microfotografía con microscopía electrónica (3 000 X). Se observan células de Schwann = Sch, nf = neurofilamentos, m = mitocondrias, Am = axones mielinizados, n = neurotúbulos, Aa = axones amielínicos y fibrina = f del grupo experimental axotomizado y tubulizado con prótesis de quitosana sin neuroesteroide; la barra indica 2 μ m.

Figure 2: Microphotography with electronic microscopy (3 000 X). Schwann cells are observed = Sch, neurofilaments = nf, mitochondria = m, myelinated axons = Ma, neurotubules = n, amyelinic axons = Aa, and fibrine = f from the axotomized and tubulized with chitosan prosthesis without neurosteroid experimental group; the bar indicates 2 μ m.

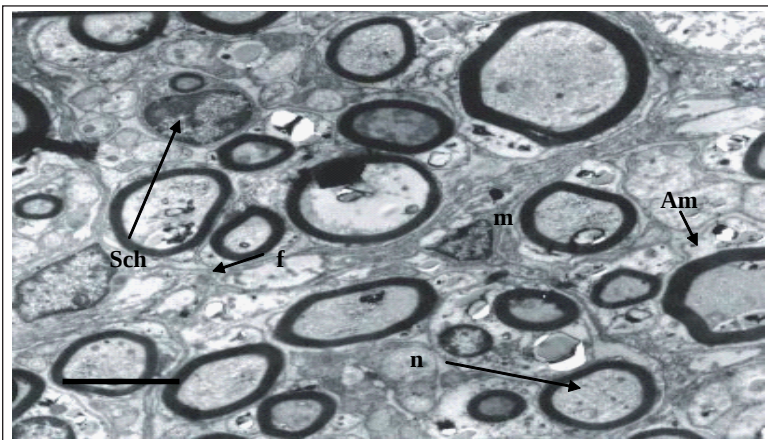


Figura 3: Microfotografía con microscopía electrónica (3 000 X) Se observan células de Schwann = Sch, nf = neurofilamentos, m = mitocondrias, Am = axones mielinizados, n = neurotúbulos, Aa = axones amielínicos y fibrina = f del grupo experimental axotomizado y tubulizado con prótesis de quitosana y el neuroesteroide pregnenolona; la barra indica 2 μ m.

Figure 3: Microphotography with electronic microscopy (3 000 X). Schwann cells are observed = Sch, neurofilaments = nf, mitochondria = m, myelinated axons = Ma, neurotubules = n, amyelinic axons = Aa, and fibrine = f from the axotomized and tubulized with chitosan prosthesis and pregnenolone neurosteroid experimental group; the bar indicates 2 μ m.

Cuadro 1

NÚMERO DE AXONES MIELINIZADOS DEL SEGMENTO REGENERADO
DEL NERVIO CIÁTICO AXOTOMIZADO Y TUBULIZADO

NUMBER OF MYELINATED AXONS OF THE REGENERATED SEGMENT
OF THE AXOTOMIZED AND TUBULIZED SCIATIC NERVE

<i>Group</i>	<i>Proximal segment</i>	<i>Distal segment</i>
Control/Not injured	0.23 ± 0.09 (a standard error)	
Chitosan	0.20 ± 0.02	0.21 ± 0.03
Pregnenolone	0.17 ± .0.02	0.21 ± 0.02

ANOVA “Tukey” $P < 0.05$ (χ^2 1 week, n = 5).

Cuadro 2

NÚMERO DE AXONES NO MIELINIZADOS DEL SEGMENTO REGENERADO
DEL NERVIO CIÁTICO AXOTOMIZADO Y TUBULIZADO

NUMBER OF AXONS NOT MYELINATED OF THE REGENERATED SEGMENT
OF AXOTOMIZED AND TUBULIZED SCIATIC NERVE

<i>Group</i>	<i>Proximal</i>	<i>Distal</i>
Control/Not injured	65.30 ± 5.64 (standard error)	
Chitosan	65.60 ± 7.07	55.30 ± 5.02
Pregnenolone	64.90 ± .7.21	53.80 ± 4.35

ANOVA “Tukey” $P < 0.05$ (χ^2 1 week, n = 5).

Cuadro 3

PROPORCIÓN “G” INDICA EL GRADO DE MADUREZ DEL AXÓN REGENERADO
“G” PROPORTION INDICATES MATURATION DEGREE OF THE REGENERATED AXON

<i>Group</i>	<i>Proximal</i>	<i>Distal</i>
Control/Not injured	67.33 ± 9.80 (standard error)	
Chitosan	59.16 ± 7.65	66.33 ± 8.93
Pregnenolone	65.33 ± 9.25	60.66 ± 70.37

ANOVA Tukey” $P < 0.05$ (χ^2 1 week, n = 5).

without the pregnenolone pre-loaded in the prostheses and the cytoarchitecture was organized the same as an intact nerve.^{30,47}

It was concluded that the use of the chitosan prosthesis is a therapeutic alternative for repairing defects of peripheral nerves of 15 mm and of a greater caliber than the evaluated in rodents and rabbits, and in this way, one more tool is offered to the neurosurgeon in the repair of damaged peripheral nerves.

It is necessary to perform complementary studies directed to evaluate the immune response of the receptor, possible effects in the long term because of prosthesis' degeneration, the use of this type of prosthesis in repairing greater defects, as well as to demonstrate that the impulse conduction and neuromotor plate regeneration of the regenerated nerve is similar to the intact nerve.

Acknowledgements

The financing for achieving this project was contributed by Conacyt (number M-30437) and the University of Guadalajara.

Referencias

1. Afifi AK. Neuroanatomía funcional. Texto y Atlas. México (DF): McGraw-Hill Interamericana, 1999.
2. Gil J. Protocolo de disección del perro. Barcelona: Masson, SA, 1997.
3. Sisson S, Grossman JD. Anatomía de los animales domésticos. 5ª ed. México (DF): Ciencia y Cultura Latinoamericana, SA de CV, 1994.
4. Vassilis EK, Rajiv RR. Cell death and diseases of the nervous system. Totowa, Nueva Jersey: Humana Press, 1986.
5. Garbay B, Heape AM, Sargeil F, Cassage C. Myelin synthesis in the peripheral nervous system. Prog Neurobiol 2000;61:267-304.
6. Smith KS, Kapoor R, Hall SM, Davies M. Electrically Active Axons Degenerate When Exposed to Nitric Oxide. Ann Neurol 2001; 49:470-476.
7. Araki T, Milbrandt J. Ninjurin, a novel adhesion molecule, is induced by nerve injury and promotes axonal growth. Neuron 1996;17:353-361.
8. Broussignac P. Un Haut polymere naturel peu connu dans l' Industrie Le Chitosane. Chimie et Industrie-Genie Chimique 1968;99:241.
9. Gabrielson G, Stenstrom JA. Contribution to peripheral nerve suture technique. Plast Reconstr Surg 1996;38:68-72.
10. Müller HW, Stoll G. Nerve injury and regeneration: basic insights and therapeutic interventions. Curr Opin Neurobiol 1998;11:557-562.
11. Perry V, Luner E, Brown M. Evidence that the rate of Wallerian degeneration is controlled by a single autosomal dominant gene. Eur J Neurosci 1990;2:402-408.
12. Chaudry V, Glass J, Friffin J. Wallerian degeneration

El análisis de la proporción "g" de los axones mielinizados indicó que no hubo diferencias significativas entre los tratamientos con respecto al grupo testigo (F, 5, 45 = 0.64, P > 0.05). Sin embargo, cabe aclarar que de nuevo el grupo quitosana seguido de pregnenolona mostró menor proporción, ello demuestra que los axones de estos grupos tienen mayor espesor de mielina; por lo tanto, presentan mejor regeneración (Cuadro 3).

Discusión

La recuperación de la herida quirúrgica de todos los animales se logró a los diez días poslesión y poco a poco las hembras que fueron axotomizadas y tubulizadas recuperaron la función motora y sensitiva de la pierna lesionada, ello comprobó la efectividad de la técnica de tubulización, pues permitió la concentración de factores tróficos y la reconexión axonal, evitando así su degeneración.^{14,35,37} Como consecuencia de ello, los nervios se regeneraron en su totalidad de acuerdo con los hallazgos macroscópicos y microscópicos observados, lo cual coincide con otros autores.^{19,35,47}

De acuerdo con los resultados, la quitosana, por sus propiedades especiales, como la baja toxicidad, catiónica, biodegradable, antimicrobiana e hipoalérgica, permitieron mostrar su utilidad en la reparación de nervios con calibres semejantes al del humano, ya que a los diez días poslesión, las hembras que fueron axotomizadas y tubulizadas con o sin pregnenolona, recuperaron la función motora y sensitiva de la pierna lesionada.^{14,35,37} Debido a estos factores, los nervios se regeneraron en su totalidad según los hallazgos macroscópicos y microscópicos observados.^{19,35,47}

Aunque la regeneración se dio sin que importara el tratamiento en las hembras tubulizadas, se comprobó que el biomaterial quitosana funciona para aplicar tratamientos *in situ*, evitando los efectos de los tratamientos sistémicos, así una segunda cirugía para retirar la prótesis, como ocurre con otros materiales, ya que permitió ser degradada lentamente durante los 60 días del estudio, asegurando con esto la liberación prolongada del neuroesteroide pregnenolona que fue precargado en su matriz.³⁹

Los hallazgos macroscópicos de la regeneración de los nervios se comprobaron con microscopía de luz y electrónica de transmisión, lo cual determinó que se encontraba en una etapa avanzada y madura. Se presentó la reconexión de los nervios axotomizados y tubulizados sin importar si tenían o no pregnenolona precargada en las prótesis y la citoarquitectura estaba organizada igual que la de un nervio intacto.^{30,47}

Se concluye que el uso de prótesis de quitosana es una alternativa terapéutica adecuada para la repara-

- in peripheral nerve disease. *Neurol Clin* 1992;10:613-627.
13. Dumitru, D. Reaction of the peripheral nervous system to injury. In *electrodiagnostic medicine*. Filadelfia: Ed Hanley-Belfus Inc, 1994.
 14. Weiss P. The technology of nerve regeneration. Sutureless tubulation and related methods of nerve repair. *Neurosurgery* 1944;1:400-450.
 15. Ayala H. Estudio Experimental en la cirugía de los nervios periféricos. *Rev Ortop Traum* 1997;2:3-14.
 16. Sulaiman ARO, Gordon T. Effects of Short- and Long-Term Schwann Cell. Denervation on Peripheral Nerve Regeneration, Myelination, and Size. *Glia* 2000;32: 234-246.
 17. Barakat W. The role of thyroid hormones and their receptors in peripheral nerve regeneration. *J Neurobiol* 1999;40:541.
 18. Jones, KJ. Gonadal steroids and neuronal regeneration. A therapeutic role. *Adv Neurol* 1993;59(a):227-240.
 19. Jones KJ. In axonal regeneration. Brain Gonadal steroids as promoting factors. *Res Bull* 1993;30:491-498.
 20. Terris D, Fee W. Current issues in nerve repair. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 1993; 119:725.
 21. Kabbadj K, El-Etr M, Baulieu EE, Robel P. Pregnenolone metabolism in rodent embryonic neurons and astrocytes. *Glia* 1993;7:170-175.
 22. Garcia-Estrada J, Luquin S, Ana MF, Garcia-Segura LM. Dehydroepiandrosterone, pregnenolone and sex steroids down-regulate reactive astroglia in the male rat brain after a penetrating. *Int J Devl Neurosci* 1999;17:145-151.
 23. Jung-Testas I, Schumacher M, Robel M, Baulieu EE. Acciones of steroids hormones and growth factors on glial cells of the central and peripheral nervous system. *J Steroids. Biochem Molec* 1994;48:145-154.
 24. Morfin R, Young J, Corpéchet C, Egestad B, Sjövall J, Baulieu EE. Neurosteroids; pregnenolone in human sciatic nerves. *Proc Natl Acad Sci* 1992;89:6790-6793.
 25. Akawa SN, Guezou M, Robel P, Baulieu EE, Goascone L. Astrocytes and neurosteroides. Metabolism of pregnenolone and dehydroepiandrosterone. Regulation by cell density *J Cell Biology* 1993;121:135-143.
 26. Wong BJ, Mattox DE. Experimental nerve regeneration. A Review. *Otolaryngol Clin North Am* 1991; 24:739-752.
 27. Hall S. Axonal regeneration through acellular muscle grafts. *J Anatomy* 1997;190:57-71.
 28. Spector G, Lee P, Derby A, Friedich G, Burke J, Vogler P. Facial nerve regeneration through semipermeable chambers in the rabbit. *Laryngoscope* 1992;102:784.
 29. Aguado A, David S, Richardson P, Bray G. Axonal elongation in peripheral and central nervous system transplants. *Adv Cell Neurobiol* 1982;3:215.
 30. Baley S, Villadiego A, Eichler M, Rich K. The influence of fibronectin and laminin during Schwann cell migration and peripheral nerve regeneration through silicon chambers. *J Neurocytol* 1993;22:176.
 31. Salonen V, Peltonen J, Roytta M. Laminin in traumatized peripheral nerve: basement membrane changes

ción de defectos de nervios periféricos de 15 mm y de un calibre mayor a los evaluados en roedores y conejos, y de esta forma se aporta al neurocirujano una herramienta más en la reparación de nervios periféricos lesionados.

Es necesario realizar estudios complementarios dirigidos a evaluar la respuesta inmune del receptor, posibles efectos a largo plazo por la degradación de la prótesis, el uso de este tipo de prótesis en la reparación de defectos mayores, así como demostrar que la conducción del impulso y la regeneración de la placa neuromotora del nervio regenerado es semejante al del nervio intacto.

Agradecimientos

El financiamiento para la realización de este proyecto fue aportado por el Conacyt (número M-30437) y por la Universidad de Guadalajara.

-
- during degeneration and regeneration. *J Neurocytol* 1987;16:713.
32. Davis G, Varon S, Engvall E, Manthorpe M. Substratum-binding neurite-promoting factors: relationships to laminin. *Trends Neurosci* 1985;8:528.
 33. Terris D, Fee WE. Current issues in nerve repair. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg.* 1993;119:725-731.
 34. Campbell JB, Bassett CA, Husby J, Thulin CA, Feringa ER. Microfilter sheaths in peripheral nerve surgery. *J Trauma* 1961;11:139-157.
 35. Braun R. Comparative studies of neuroorrhaphy and sutureless peripheral nerve repair. *Surg Gynecol Obstet* 1966;122:15-18.
 36. Yoshii S. Peripheral nerve regeneration along collagen filaments. *Brain Res* 2001;888:158-162.
 37. Pham H, Padilla J, Nguyen K, Rosen J. Comparison of nerve repair techniques: suture vs avitene-polyglycolic acid tube. *J Reconstr Microsurg* 1991;7:31-36.
 38. Shepherd R, Reader S, Falshaw A. Chitosan functional properties. *J Glyco Conj* 1997; 14:535.
 39. Kas HS. Chitosan: properties, preparations and application to microparticulate systems. *J Microencap* 1997;14:689-711.
 40. Varum K, Holme H, Izume M, Stokke BT, Smidsrd O. Determination of enzymatic hidrolisis specificity of partially N-acetylated of concentrated solutions of chitosans. *Biochim Biophys Acta* 1996;1297:5.
 41. Hirano S. Novel metod for the preparation of N-acetylchitosan fiber and N-acetylchitosan cellulose fiber. *Biomaterials* 1998;19:3293.
 42. Lorenzo-Lamosa M, Remuñan-Lopez J. Design of microencapsulated chitosan microspheres for colonic drug delivery. *J Controll Rel* 1998; 52:109-118.
 43. Lee KY. Blood compatibility and biodegradability of partially N-acetylated chitosan derivateds. *Biomaterials* 1995;15:1211-2116.
 44. Koenig HL, Schumacher M, Ferzas B, Do Thi A, Res-souches A, Guennoun R *et al.* Progesterone synthe-

- sis and myelin formation by Schwann Cells. Science 1995;268:1500-1503.
45. Jameela S, Jayakrishnan A. Glutaraldehyde cross-linked chitosan microspheres as a long acting biodegradable drug delivery vehicle: studies on the *in vitro* release of mitoxantrone and *in vivo* degradation of microspheres in rat muscle. Biomaterials 1995;16:769-775.
 46. Rao SB, Sharma OP. Use of chitosan as a biomaterial: studies on its safety and haemostatic potential. J Biomed Mater Res 1997;34:21.
 47. Williams L, Azzam N, Zalewski A, Azzam R. Regeneration axons are not required to induce the formation of a Schwann cell cable in a silicone chamber. Exp Neurol 1993;120:49.
 48. Spencer P, Weinberg H, Krygier BV. An *in vivo* method to prepare normal Schwann cells free of axons and myelin. Brain Res 1979;165:119.
 49. Várur K, Izume M, Holme H, Stokke BT, Smidsrud O. Determination of enzymatic hydrolysis specificity of partially N-acetylated chitosans. Biochem Biophys Acta 1996;5:1291.
 50. Lundborg G, Abrahamson S, Rosen B, Dahlin L, Danielsen N. Tubular repair of the median nerve in the human forearm. J Hand Surg Brit Eur 1994;19B:273.
 51. Chen Z, Wang M. Effects of nerve growth factor on crushed sciatic nerve regeneration in rats. Microsurgery 1995;16:547.