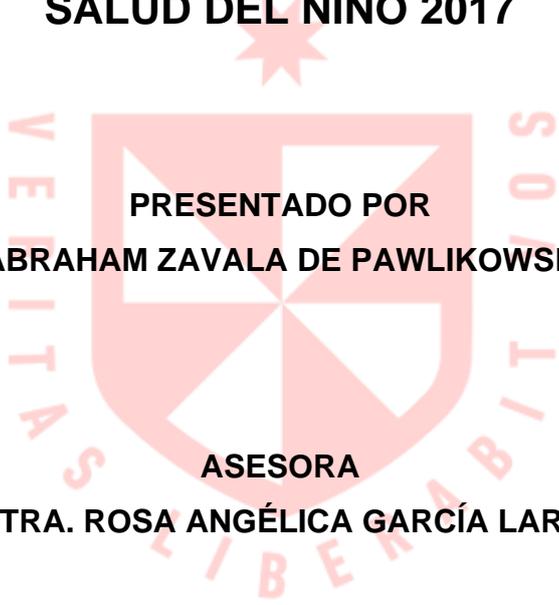


FACULTAD DE MEDICINA HUMANA
UNIDAD DE POSGRADO

**PLASMA RICO EN PLAQUETAS Y CURCUMINA EN
REGENERACIÓN AXONAL DE LESIONES AGUDAS DEL
NERVIO CIÁTICO EN RATAS INSTITUTO NACIONAL DE
SALUD DEL NIÑO 2017**



PRESENTADO POR
ABRAHAM ZAVALA DE PAWLIKOWSKI

ASESORA
MTRA. ROSA ANGÉLICA GARCÍA LARA

PROYECTO DE INVESTIGACIÓN
PARA OPTAR EL GRADO ACADÉMICO DE
SEGUNDA ESPECIALIDAD EN CIRUGÍA PLÁSTICA Y RECONSTRUCTIVA

LIMA, PERÚ
2018



CC BY-NC-ND

Reconocimiento – No comercial – Sin obra derivada

El autor sólo permite que se pueda descargar esta obra y compartirla con otras personas, siempre que se reconozca su autoría, pero no se puede cambiar de ninguna manera ni se puede utilizar comercialmente.

<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>



**FACULTAD DE MEDICINA HUMANA
SECCIÓN DE POSGRADO**

**PLASMA RICO EN PLAQUETAS Y CURCUMINA
EN REGENERACIÓN AXONAL DE LESIONES AGUDAS
DEL NERVIO CIÁTICO EN RATAS
INSTITUTO NACIONAL DE SALUD DEL NIÑO 2017**

PROYECTO DE INVESTIGACIÓN

PARA OPTAR

**EL TÍTULO DE SEGUNDA ESPECIALIDAD EN
CIRUGÍA PLÁSTICA Y RECONSTRUCTIVA**

**PRESENTADO POR
ABRAHAM ZAVALA DE PAWLIKOWSKI**

**ASESOR
MTRA. ROSA ANGÉLICA GARCÍA LARA**

LIMA, PERÚ

2018

ÍNDICE

	Págs.
Portada	i
Índice	ii
CAPÍTULO I: PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	1
1.1 Descripción de la situación problemática	1
1.2 Formulación del problema	4
1.3 Objetivos	4
1.3.1 Objetivo general	4
1.3.2 Objetivos específicos	4
1.4 Justificación	5
1.4.1. Importancia	5
1.4.2. Viabilidad	6
1.5 Limitaciones	6
CAPÍTULO II: MARCO TEÓRICO	8
2.1 Antecedentes	8
2.2 Bases teóricas	11
2.3 Definición de términos básicos	15
CAPÍTULO III: HIPÓTESIS Y VARIABLES	16
3.1 Formulación de la hipótesis	16
3.2 Variables y su operacionalización	16
CAPÍTULO IV: METODOLOGÍA	18
4.1 Tipos y diseño	18
4.2 Diseño muestral	18
4.3 Procedimientos de recolección de datos	19
4.4 Procesamiento y análisis de datos	21
4.5 Aspectos éticos	30
CRONOGRAMA	31
PRESUPUESTO	32
FUENTES DE INFORMACION	33
ANEXOS	
1. Matriz de consistencia	43
2. Instrumento de recolección de datos	45
3. Protocolo experimental para trabajos con animales	46
4. Clasificación de la severidad de los procedimientos	56
5. Guía para el cuidado y manejo de animales de laboratorio	65

CAPÍTULO I: PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

1.1 Descripción de la situación problemática

Las lesiones del nervio periférico, definidas como aquellas que afectan a cualquier nervio fuera del sistema nervioso central (SNC) se han reportado en el 2,8% de todos los pacientes con traumatismos. Actualmente, el tratamiento, cuando estas lesiones son de tipo neurotmesis o axonotmesis severa, consta de la coaptación microquirúrgica de los cabos del nervio lesionado. Sin embargo, los resultados a largo plazo en lesiones severas, generalmente, no son satisfactorios. Neuromas dolorosos, fibrosis y alteraciones de la sensibilidad o limitaciones en la función motora son algunos de los efectos no deseados que ocurren posteriores a una regeneración nerviosa no óptima. Estos resultados se ven afectados por diversos factores: algunos propios de la misma lesión y otros del tratamiento recibido.

Dentro de las características que influyen, en el resultado clínico final, está la localización de la lesión (proximal versus distal al órgano efector), el tipo de lesión (neurapraxia versus axonotmesis versus neurotmesis) y el tiempo transcurrido entre el momento de la lesión y la reparación quirúrgica del nervio.

A su vez, actualmente se conocen ciertos agentes coadyuvantes que, mediante el transporte de elementos celulares y/o tróficos al sitio de la lesión, estimulan, de manera positiva, la regeneración axonal en lesiones agudas del nervio periférico. Es por esto que, actualmente, las investigaciones están avocadas a encontrar métodos más efectivos, los cuales, más allá de la reparación quirúrgica del nervio,

incluyan este tipo de agentes coadyuvantes que permitan obtener resultados clínicos satisfactorios.

El plasma rico en plaquetas, ampliamente estudiado y utilizado en cirugía plástica, contiene numerosos factores de crecimiento que inician la angiogénesis y contribuye a la reparación de diversos tipos de tejido, mediante el aumento de las propiedades mitóticas y quimiotácticas de células indiferenciadas, además de diversos factores neurotróficos que produce un efecto positivo en la regeneración nerviosa.

La curumina es el principio activo extraído de los rizomas de la cúrcuma longa, una planta herbácea utilizada como condimento y colorante alimentario que, si bien es originario del suroeste de la India, crece, se cultiva y se comercializa en diversos países de América Latina.

Desde hace algunos años, la curcumina ha venido siendo estudiada y se ha demostrado que tiene propiedades antiinflamatorias, anticarcinogénicas y antioxidantes, así como un valor terapéutico potencial en el tratamiento de enfermedades neurodegenerativas. Asimismo, es importante mencionar que ha demostrado la capacidad de inhibir la apoptosis y pérdida neuronal, y de mejorar la función motora posterior a lesiones de médula espinal. Incluso, algunos estudios recientes ensayan la posibilidad de que, administrada a dosis altas, promueva la regeneración axonal en lesiones del nervio periférico.

Sin embargo, ninguno de estos ha estudiado el efecto de ambos agentes coadyuvantes de manera comparativa, así como su efecto utilizado de manera conjunta. En nuestro país, el tratamiento quirúrgico de las lesiones del nervio periférico se realiza de manera adecuada en muy pocas instituciones, debido generalmente a que requiere la infraestructura adecuada y un entrenamiento específico en técnicas microquirúrgicas de reparación nerviosa. Más aún, en ninguno de los centros en los que se llevan a cabo estos procedimientos, se utiliza agentes coadyuvantes. Esto, como es lógico, condiciona los resultados clínicos.

En el Instituto Nacional de Salud del Niño de San Borja, se recibe, de manera periódica, lesiones nerviosas producto de traumatismos, procedentes de diversas regiones del Perú. A su vez, es la única institución del país que realiza cirugías correctivas de lesiones obstétricas del plexo braquial, una patología todavía frecuente en nuestro medio dado el alto porcentaje de partos domiciliarios que aún conservamos y la poca adherencia a los controles prenatales por parte de las gestantes en nuestro país.

Es por esto que es importante determinar si la administración de agentes coadyuvantes como el plasma rico en plaquetas y la curcumina, que son disponibles, inocuos, de bajo costo y accesibles en un medio como el nuestro, son de utilidad en el manejo de lesiones nerviosas y mejoran el proceso de regeneración axonal y, por ende, la calidad de vida de los pacientes.

1.2 Formulación del problema

¿La administración local de plasma rico en plaquetas y la intraperitoneal de curcumina mejora la regeneración axonal en lesiones agudas reparadas del nervio ciático en ratas, en el Instituto Nacional de Salud del Niño, en 2017?

1.3 Objetivos

1.3.1 Objetivo general

Determinar si la administración local de plasma rico en plaquetas (PRP) y/o la administración intraperitoneal de curcumina mejora la regeneración axonal en lesiones agudas reparadas del nervio ciático en ratas en el Instituto Nacional de Salud del Niño, en 2017.

1.3.2 Objetivos específicos

Verificar si la administración local de plasma rico en plaquetas (PRP) y/o la administración intraperitoneal de curcumina muestra mejores resultados en la evaluación funcional de reinervación (Sciatic Functional Index – SFI) en lesiones agudas reparadas del nervio ciático en ratas.

Establecer si la administración local de plasma rico en plaquetas (PRP) y/o la administración intraperitoneal de curcumina muestra mejores resultados en el estudio electromiográfico y de neuroconducción de lesiones agudas reparadas del nervio ciático en ratas.

Determinar si la administración local de plasma rico en plaquetas (PRP) y/o la administración intraperitoneal de curcumina muestra un aumento en el número de axones a la evaluación histológica de lesiones agudas reparadas del nervio ciático en ratas.

1.4 Justificación

1.4.1 Importancia

A pesar de haber demostrado efectos neuroprotectores y presencia de factores neurotróficos en ambos agentes, no se han publicado a la fecha estudios que investiguen el efecto combinado del plasma rico en plaquetas y de la curcumina sobre la regeneración axonal en nervios ciáticos lesionados agudamente en ratas, así como un análisis comparativo de ambos coadyuvante con resultados a nivel clínico, electrofisiológico e histológico. Este estudio servirá para determinar si la aplicación del plasma rico en plaquetas y de la curcumina produce una mejoría clínica, electromiográfica e histológica en nervios lesionados agudamente.

De obtener resultados positivos, estos serán absolutamente novedosos en el campo de la cirugía del nervio periférico, servirá como base para estudios posteriores en seres humanos que puedan ser el sustento de modificaciones en los protocolos de manejo de lesiones nerviosas, y que lleven a mejoría clínica en un período de tiempo menor y con resultados funcionales superiores a los que se consigue con el manejo actual, con la consiguiente reducción de los costos de hospitalización, los costos sociales que implican personas con discapacidades y la elevación de la calidad de vida de los pacientes.

1.4.2 Viabilidad

Se dispondrá de los ambientes adecuados y el tiempo suficiente para realizar la investigación. Se trabajará en coordinación con especialistas en: neurofisiología, anatomía patológica y con un médico veterinario encargado del correcto manejo y cuidado de los animales de experimentación.

La institución en la que se desarrollará el estudio (INSN - San Borja) proveerá los recursos materiales para el desarrollo de la investigación. Se seguirán protocolos de manejo de animales de experimentación utilizados en estudios similares anteriores, y aprobados por el Comité de Ética del INSN-SB. Se utilizará un diseño metodológico, utilizado en estudios previos con resultados satisfactorios.

1.5 Limitaciones

Debido a que el experimento incluye una reparación nerviosa, a través de técnicas microquirúrgicas, la posibilidad de alguna imperfección en la técnica o de algún evento, durante el procedimiento, surge como limitaciones de este estudio. Asimismo, al trabajar con animales de laboratorio, existe la posibilidad de que alguno de estos se enferme o muera durante el tiempo de observación.

Con respecto a los estudios neurofisiológico e histológico, al ser operador-dependiente, también cabe la posibilidad de errores en alguna de las técnicas empleadas para la medición de potenciales de acción muscular compuestos, de actividad de reposo o de unidades motoras (en el caso de los estudios neurofisiológicos), así como de errores en alguno de los métodos de procesamiento de muestras (en el caso de los estudios histológicos).

Por otro lado, al ser un estudio experimental en modelos animales, es aún imposible generalizar los resultados y utilizarlo como único argumento para modificar protocolos de manejo establecidos.

CAPÍTULO II: MARCO TEÓRICO

2.1 Antecedentes

El presente estudio presenta numerosos antecedentes científicos que avalan el uso de plasma rico en plaquetas como de curcumina para experimentar sobre regeneración nerviosa.

En el año 2010, un estudio experimental realizado en Corea del Sur comparó el uso de plasma rico en plaquetas y células madre mesenquimales derivadas del tejido neural sobre la regeneración axonal en axotomías del nervio facial en cuyes (guinea pigs). Se utilizó 24 cuyes divididos en 4 grupos de 6: grupo I (únicamente reparación microquirúrgica), grupo II (reparación microquirúrgica + PRP), grupo III (reparación microquirúrgica + células madre) y grupo IV (reparación microquirúrgica + PRP + células madre). La medición de los resultados fue: 1) funcional (cierre de ojos), 2) electrofisiológica, 3) evaluación de factores neurotróficos y 4) evaluación histológica.

La investigación determinó que, tanto en la evaluación funcional como en la electrofisiológica, los grupos II, III y IV demostraron mejores resultados en comparación al I. En la evaluación de los factores neurotróficos, el grupo II mostró una expresión marcada de estos. En el análisis histológico, el grupo IV tuvo la mayor cantidad de axones mielinizados en comparación con los demás. El trabajo concluyó que tanto el PRP como las células madre, derivadas de tejido neural, promueven la regeneración nerviosa en el nervio facial de los cuyes e, incluso, que su uso combinado reveló mayores beneficios que su uso aislado.¹⁸

En el año 2011, una revisión, realizada en Los Angeles, EE. UU., resumió varios aspectos farmacológicos *in vitro* e *in vivo* de la curcumina, así como sus mecanismos de acción subyacentes, sus objetivos a nivel molecular y las vías de señalización moduladas por la curcumina. La revisión (en base a más de 3000 artículos publicados en PubMed) estableció como conclusiones que, a pesar de ser un compuesto con poca biodisponibilidad (lo que podría significar una limitación para su uso clínico), su bajo costo, seguridad farmacológica, eficacia terapéutica comprobada y posibilidad de objetivos múltiples, hacen de la curcumina un agente prometedor en la prevención y tratamiento de diversas enfermedades humanas, más aún propone que reformulaciones en la curcumina con un mejoramiento de su biodisponibilidad pueden también ser muy prometedor en el futuro.³⁹

También, en 2011, en Turquía, se realizó un estudio similar que evaluó el uso de PRP y el factor de crecimiento similar a la insulina tipo I en lesiones de tipo neurapraxia en ratas. En este caso, se utilizó 24 ratas y se les dividió en tres grupos: grupo 1 (control, se administró solución salina), grupo 2 (tratado con IGF-I) y grupo 3 (tratado con PRP). Los resultados fueron evaluados mediante el índice funcional del Ciático (SFI), mediante una evaluación de la sensibilidad, conteo de axones y el diámetro del grosor de mielina/axon (G-ratio). El estudio demostró que, si bien el único grupo que tuvo mejores resultados estadísticamente significativos en los estudios funcionales fue el grupo 2, el G-ratio fue significativamente mejor, tanto en este grupo como en el que utilizó PRP, en comparación con el grupo control.¹⁷

En 2013, un estudio, realizado en China, comparó el uso de curcumina y mecobalamina a un grupo control para demostrar sus efectos sobre la regeneración nerviosa en lesiones de tipo neurapraxia en ratas. Los grupos de estudio se separaron de la siguiente manera: grupo I (administración intraperitoneal de curcumina 50 mg/kg, 100 mg/kg o 300 mg/kg), grupo II (administración de 100 ug/kg de mecobalamina) y grupo III (control, administración de solución salina), todos por un periodo de cuatro semanas. La investigación reveló que tanto la curcumina como la mecobalamina obtuvieron mejores resultados que el grupo control. Además, se demostró que la curcumina aplicada en dosis altas (100 a 300 mg/kg) produjo mejores resultados y promovió la regeneración axonal y la recuperación funcional que los otros grupos y que la administración a bajas dosis (50 mg/kg).²⁸

En 2016, otro estudio asiático, realizado en China, comparó las características electrofisiológicas e histológicas de la mielina en ratones sometidos a una lesión total del nervio ciático y posterior reparación inmediata a nivel de epineuro, a los que se les administró curcumina intragástrica a dosis de 40 (alta), 20 (moderada), y 10 mg/kg (baja) por una semana.

Se encontró que la mielina en los ratones que recibieron curcumina a dosis altas y moderadas apareció con una forma más regular, un espesor homogéneo y una pequeña hiperplasia alrededor. A su vez, dosis altas y moderadas de curcumina mejoraron, de manera significativa, tanto la amplitud del potencial de acción del ciático como la velocidad, lo que permitió la reparación en una lesión total del nervio ciático.³⁸

2.2 Bases teóricas

Lesiones del nervio periférico

Definidas como aquellas que afectan a cualquier nervio fuera del sistema nervioso central (SNC), se han reportado en el 2,8% de todos los pacientes con traumatismos¹. Estas ocasionan limitación en las funciones sensitivas o motoras y, generalmente, conllevan a discapacidades de largo plazo para el paciente. Aunque los axones de los nervios periféricos son capaces de regenerarse y de formar conexiones funcionales con sus órganos objetivo, muchos factores como el tipo de lesión (neurapraxia versus axonotmesis versus neurotmesis), la localización de la lesión (proximal versus distal) y el tiempo transcurrido antes de la corrección determinan el grado de los resultados funcionales posterior a la reparación.²

Degeneración Walleriana y la respuesta molecular de los nervios periféricos a la lesión

Posterior a una lesión en el nervio periférico, cambios endógenos a nivel celular y molecular activados por la misma lesión permiten a las neuronas cambiar de un fenotipo eléctricamente excitable a uno que activamente reconstruye y extiende su axón³. En esta respuesta multicelular orquestada y molecular pleiotrópica, intervienen componentes celulares (las células de Schwann, macrófagos, células endoteliales y fibroblastos), matriz extracelular y factores neurotróficos. Todo esto ocurre durante un proceso conocido como degeneración Walleriana, la cual es la degeneración de los axones distales al sitio de la lesión, y que ocurre tanto en los axones como en la mielina.¹⁰

La elongación y regeneración, a partir del cabo distal del nervio lesionado, es dependiente de un medio propicio para el crecimiento provisto por las células de

Schwann, las cuales proliferan y forman las bandas de Büngner para guiar y direccionar los axones. Numerosos estudios han encontrado que las lesiones nerviosas no solo juegan un rol clave en la modulación de las funciones de las células de Schwann, sino que también promueven la regeneración axonal, mediante la liberación de un gran número de factores relacionados a la regeneración, que incluyen citocinas, factores de crecimiento y quimioquinas^{11,12}. Esta respuesta terminará en un crecimiento y direccionamiento de los axones y reconexión de los mismos con sus órganos objetivo a una velocidad de 1 mm por día en humanos.^{13,14,15}

A pesar de estas reacciones intrínsecas, un periodo prolongado de axotomía resulta en atrofia de la neurona motora y muerte celular de neuronas sensitivas primarias.^{4,5}

El retraso en la reparación del nervio también resulta en cambios en el cabo distal del nervio (denervado), el cual gradualmente pierde su capacidad de ayudar en el proceso de regeneración con el paso de los meses.^{6,7} Estudios experimentales han demostrado que, incluso en el óptimo escenario de una reparación nerviosa inmediata, solo el 50% de neuronas regenera sus axones hacia el cabo distal.⁸ Lesiones más proximales que necesiten una larga distancia de regeneración axonal resultan en atrofia significativa del órgano objetivo, la cual es generalmente imposible de revertir. Actualmente, se vienen desarrollado diversas investigaciones sobre tratamiento y manejo de lesiones del nervio periférico, desde la sutura directa convencional hasta la terapia basada en elementos celulares.

A pesar de que muchas evidencias muestran que la sutura directa convencional o neurorrafia puede causar una reacción inflamatoria que afecta la regeneración del nervio, la práctica de la sutura para reparación de lesiones del nervio periférico sigue siendo la primera opción, debido a la falta de ensayos clínicos controlados sobre otros tipos de reparación nerviosa en seres humanos. La sutura directa convencional, sin el uso de injertos, se puede utilizar para lesiones totales de nervio periférico que dejan ausencias de tejido nervioso menores a 5 mm. Brechas mayores a 5 mm suturadas directamente muestran una tensión excesiva sobre la línea de la sutura, con resultados quirúrgicos no satisfactorios.⁴⁰

Cuando las brechas son mayores a 5 mm, generalmente se elige utilizar injertos. Los injertos autólogos de nervio son considerados la técnica *gold standard* para la reparación de lesiones de nervio periférico discontinuas. A la fecha, los injertos de nervio autólogo han ofrecido los mejores resultados en la regeneración nerviosa bajo tensión. Sin embargo, el uso de injertos de nervio autólogos está limitado a la disponibilidad de tejidos, la necesidad de un procedimiento quirúrgico adicional para levantar el injerto, la morbilidad y pérdida de función de la zona donante, la potencial diferencia en el tamaño y estructura del nervio, etc.⁴¹

Una gran variedad de factores neurotróficos y de crecimiento liberados desde el cabo proximal del nervio se incrementarían masivamente en el área lesionada del nervio periférico. Estos factores neurotróficos y de crecimiento estimularían la regeneración axonal, y es por esto que se ven implicados en las lesiones de este tipo de tejidos. Factores de crecimiento, incluido el factor de crecimiento nervioso (NGF), la neurotrofina-3 y el factor de crecimiento fibroblástico básico (BFGF), que

estimulan el crecimiento axonal y la supervivencia neuronal, han sido añadidos en soluciones a las áreas lesionadas mediante diversos agentes coadyuvantes que los contienen, con la finalidad de evaluar posibles mejoras a niveles clínico, histológico y anátomo-patológico.⁴²

Plasma rico en plaquetas y curcumina en la regeneración nerviosa

El plasma rico en plaquetas (PRP), preparado mediante la centrifugación de la sangre del propio paciente, contiene numerosos factores de crecimiento que inician la angiogénesis y contribuyen a la reparación de diferentes tipos de tejido mediante el aumento de las propiedades quimiotácticas y mitóticas de células indiferenciadas²². Estudios recientes han demostrado, además, que posee numerosos factores neurotróficos como la neurotrofina-3 (NT-3), la angiopoyetina-1, el factor neurotrófico derivado de las células giliales (GDNF) y el factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF).^{16,17,18} El uso de estos factores neurotróficos ha sido investigado y sus beneficios en la regeneración nerviosa han sido reportados.^{9,19,20,21}

La curcumina (1,7-bis (4-hidroxi-3-metoxifenil)-1,6-heptadieno-3,5-dione) es un compuesto natural extraído de las raíces de la *Curcuma longa* (Zingiberaceae). Esta ha exhibido una variedad de propiedades farmacológicas, incluidas la antiinflamatoria, la anticarcinogénica y la antioxidante.²³ Recientemente, el valor terapéutico potencial de la curcumina en el tratamiento de las enfermedades neurodegenerativas ha sido reconocido en numerosas investigaciones;^{24,25,26,27} ha demostrado la capacidad de inhibir la apoptosis y pérdida neuronal y mejorar la función motora posterior a una lesión de médula espinal en ratas.²⁷ Estos estudios

evidencian propiedades neuroprotectoras en la curcumina y ensayan la posibilidad de que, administrada intraperitonealmente a dosis altas (300 mg/kg), a su vez promueva la regeneración nerviosa posterior a lesiones del nervio periférico.²⁸

A pesar de las recientes investigaciones, ningún tratamiento administrado como único coadyuvante a la reparación quirúrgica ha conseguido una exitosa regeneración del nervio. El objetivo del presente estudio es investigar el efecto del plasma rico en plaquetas y de la curcumina sobre la regeneración axonal en el nervio ciático de un modelo animal (ratas).

2.3 Definición de términos básicos

Regeneración nerviosa: capacidad propia de los nervios periféricos de restablecer sus fibras mediante un conjunto de procesos que incluye la degeneración walleriana, la degeneración primaria, retrógrada, proximal a la lesión, y el recrecimiento y recanalización de los axones.

Plasma rico en plaquetas: material biológico autólogo concentrado de plaquetas humanas en un volumen pequeño de plasma que contiene niveles elevados de factores de crecimiento.

Curcumina: compuesto natural extraído de las raíces de la planta *Curcuma longa* (Zingiberaceae), originaria de la India. Existen al menos dos formas de la curcumina, ambas tautómeras: la ceto y la enol. La ceto se encuentra en forma sólida y la enol como un líquido. Es soluble en etanol y en ácido acético concentrado.²⁹

CAPÍTULO III: HIPÓTESIS Y VARIABLES

3.1 Formulación de la hipótesis

H_i: El plasma rico en plaquetas, administrado localmente, y la curcumina, administrada intraperitonealmente, por un período de 12 semanas, mejoran la regeneración axonal en lesiones agudas reparadas del nervio ciático en ratas.

H_o: El plasma rico en plaquetas administrado localmente y la curcumina administrada intraperitonealmente, por un período de 12 semanas, no mejoran la regeneración axonal en lesiones agudas reparadas del nervio ciático en ratas.

3.2 Variables y su operacionalización

Independientes

Administración local de plasma rico en plaquetas

Administración intraperitoneal de curcumina

Dependientes

Índice funcional del ciático (SFI)

Amplitud y excitación del potencial de acción motor compuesto (PAMC) –
Neuroconducción

Actividad de reposo y unidades motoras – electromiografía

Número de axones

VARIABLES	DEFINICIÓN	Tipo por su Naturaleza	Indicador	Escala de medición	Categorías y sus valores	Medio de verificación
Plasma rico en plaquetas	Administración local de PRP en la zona de sutura durante el acto quirúrgico	Cualitativa	Administración de PRP	Nominal	SÍ NO	Registro del procedimiento o en ficha
Curcumina	Administración intraperitoneal de 300mg/kg de Curcumina diluida en NaCl 0.9% cada 24 horas por 12 semanas	Cualitativa	Administración de Curcumina	Nominal	SÍ NO	Registro del procedimiento o en ficha
Índice funcional del ciático	Cálculo del Índice Funcional del Ciático (SFI) en base a evaluación funcional de la rata (test de la marcha) a las 4 semanas y a las 12 semanas posteriores a la cirugía.	Cuantitativa	Puntaje en el índice	De razón	-150 – 0	Tabla del SFI
Amplitud y excitación del potencial de acción - neuroconducción	Evaluación de la amplitud y excitación del PAMC basal, a las 2 semanas y a las 12 semanas posteriores a la cirugía	Cuantitativa	Milivoltios	De razón	0 – a más	Electromiógrafo
Actividad de reposo y unidades motoras - Electromiografía	Evaluación de la actividad de reposo y de las unidades motoras a las 2 semanas y a las 12 semanas posteriores a la cirugía	Cualitativa	Tipo de unidades motoras	Nominal	UM Normales ó UM de Reinervación	Electromiógrafo
Número de axones	Conteo del número de axones mediante microscopía óptica y microscopía electrónica a las 12 semanas posteriores a la cirugía	Cuantitativa	Número de axones	De razón	0 – a más	Visualización microscópica del tejido

CAPÍTULO IV: METODOLOGÍA

4.1 Tipos y diseño

Estudio experimental: ensayo clínico.

4.2 Diseño muestral

Población universo

Ratas albinas Holtzman hembras.

Población de estudio

Ratas Albinas Holtzman hembras de entre 200 y 300 g.

Tamaño de la muestra

24 ratas.

Muestreo

Por conveniencia.

Criterios de selección

Criterios de inclusión

Ratas albinas Holtzman hembras sin moribilidades.

Criterios de exclusión

Ratas de una raza diferente a Holtzman.

Ratas albinas Holtzman machos.

Ratas albinas Holtzman que presenten alguna morbilidad.

4.3 Procedimientos de recolección de datos

Preparación del plasma rico en plaquetas

El PRP se obtuvo mediante un sistema de centrifugación cerrada simplificada según el método descrito por Kovacs et al²⁹. Cinco ratas serán sacrificadas y utilizadas como fuente de sangre. Del corazón de cada rata se obtendrá 5 mL de sangre fresca, que será tratada con citrato de sodio al 10% en un tubo estéril. Posterior a obtener la sangre de cada rata, se realizará una centrifugación a 200g/min por 10 minutos.

Se observará, entonces, una fracción roja inferior (componente celular) y una fracción superior amarillenta turbia (componente sérico). Se aspirará todo el componente sérico y se transferirá a un nuevo tubo estéril, en donde se le someterá a una nueva centrifugación a 300g/min por 15 minutos. La fracción inferior de esta nueva centrifugación, aquella con el plasma rico en plaquetas, es la que se utilizará en el experimento.

Métodos experimentales

Todos los procedimientos quirúrgicos serán realizados bajo condiciones asépticas. Las ratas serán anestesiadas con pentobarbital sódico (40mg/kg) mediante inyección intraperitoneal. El nervio ciático izquierdo será expuesto a través de una incisión en el músculo glúteo y se realizará la sección del nervio proximal a la bifurcación tibio-peronea. La reparación microquirúrgica del nervio se realizará de

manera inmediata a través de un microscopio Zeiss OPMI pico (Carl Zeiss, Goettingen, Alemania) utilizando nylon monofilamento 10/0.

Los animales serán divididos aleatoriamente en cuatro grupos:

a) Grupo I: Reparación nerviosa inmediata con dos puntos de sutura 10/0 nylon monofilamento a nivel del perineuro.

b) Grupo II: Reparación nerviosa inmediata con dos puntos de sutura 10/0 nylon monofilamento a nivel del perineuro + administración local de PRP.

c) Grupo III: Reparación nerviosa inmediata con dos puntos de sutura 10/0 nylon monofilamento a nivel del perineuro + administración intraperitoneal diaria de Curcumina (300mg/kg) por 12 semanas.

d) Grupo IV: Reparación nerviosa inmediata con dos puntos de sutura 10/0 nylon monofilamento a nivel del perineuro + administración local de PRP + administración intraperitoneal diaria de Curcumina (300mg/kg) por 12 semanas

Los planos muscular y cutáneo serán suturados con vicryl (poliglactina) 4/0.

Se utilizará curcumina en polvo de la marca Macro Natura S.A.C. (Registro Sanitario E4602416N DIGESA / NAMCNT – RUC 20498934421 – INDECOPI 000602-2012-DSD)

4.4 Procesamiento y análisis de datos

Evaluación Funcional de Reinervación

Índice Funcional del Ciático (“Sciatic Functional Index” - SFI)³³

El análisis de las huellas, al caminar, se realizará a las 4 y 12 semanas posteriores a la cirugía, basado en el estudio previo de Tuncel et al.³⁰. Las longitudes del tercer dedo al talón (PL) del primer dedo al quinto dedo (TS), y del segundo dedo al cuarto dedo (IT) serán medidos en el lado experimental (E) y en el lado contralateral normal (N) en cada rata. El índice funcional del ciático (SFI) de cada animal será calculado mediante la siguiente fórmula:³²

$$\text{SFI} = -38.3 \times (\text{EPL}-\text{NPL})/\text{NPL} + 109.5 \times (\text{ETS}-\text{NTS})/\text{NTS} + 13.3 \times (\text{EIT}-\text{NIT})/\text{NIT}-8.8$$

En general, el SFI oscila alrededor de 0 para una función nerviosa normal, mientras que un SFI de alrededor de -100 representa disfunción total. Es decir, un SFI mayor significa una mejor función del nervio ciático.

Evaluación neurofisiológica

Se realizará estudios neurofisiológicos que incluirán la neuroconducción del nervio ciático registrando en el músculo gastrocnemio y la electromiografía del gastrocnemio.

Para la neuroconducción se colocará un estímulo eléctrico en una zona proximal a la lesión y se medirá el potencial de acción muscular compuesto (PAMC) en el músculo gastrocnemio a través de una aguja. Este estudio se realizará previo a la cirugía (medición basal), a las 2 semanas y a las 12 semanas posteriores a la

cirugía de acuerdo a protocolos desarrollados previamente en la literatura³⁴. Se comparará la amplitud del PAMC basal con el registro a las 12 semanas.

El estudio electromiográfico se realizará mediante la colocación de una aguja en el músculo gastrocnemio. Se registrará actividad de reposo en busca de denervación (ondas positivas y fibrilaciones indican denervación o daño axonal) y unidades motoras (neuropáticas indican reinervación). Este estudio se realizará a las dos semanas y a las 12 semanas posteriores a la cirugía de acuerdo a protocolos desarrollados previamente en la literatura³⁵.

Evaluación histológica

El estudio histológico se realizará 12 semanas después de la cirugía. Las ratas serán sacrificadas mediante la administración de una dosis alta de pentobarbital sódico. Los nervios ciáticos izquierdos (experimentales) y derechos (controles) serán disecados y se realizará la exéresis de un fragmento del nervio con el corte distal a 3 mm de la zona de sutura y proximal a 3 mm de la zona de sutura (en los experimentales).

Se realizará la evaluación de las muestras a través de microscopía de luz y de microscopía electrónica de transmisión. En el nervio, el análisis de microscopía electrónica de transmisión permite investigar diversas características ultraestructurales, incluyendo la organización de mielina y los axones mielinizados. Para procesamiento en microscopio electrónico, se seleccionarán sólo muestras específicas, de las que se querían obtener más detalles morfológicos e histológicos:

Microscopía de luz

1. Fijación: se utilizará Formaldehído al 4% en PBS (tampón fosfato salino) durante 24 horas a 4°C. Esta fijación se seguirá de un lavado en en PBS.

a. Solución salina tamponada con fosfato (PBS) pH 7.4 a 25°C: Para obtener 1 l, se mezclan los siguientes componentes: 8 g de NaCl, 0.2 g de KCl, 1.44 g de Na₂HPO₄ y 0.24 g de KH₂PO₄. Se ajusta el pH a 7.4 a 25°C con NaOH 1N y el volumen a 1 l con H₂O.

2. Inclusión: Las muestras se someterán a un procedimiento de deshidratación en etanol de gradación creciente (del 50% al 100%). La deshidratación se seguirá por un paso de diafanización en xilol. Las muestras se mantendrán a continuación en parafina líquida a 62 °C durante la noche. Las secciones nerviosas se cortarán en un rango de espesor de 5 µm. Antes de la tinción, los portaobjetos serán desparafinados.

3. Tinción: Las secciones delgadas de las muestras nerviosas se cortarán con el microtomo y se teñirán con hematoxilina – eosina y azul de toluidina (al 1% en solución de tetraborato sódico al 1%) de 30 a 45 segundos.

Microscopía electrónica

1. Fijación: Las muestras recibidas se fijarán en glutaraldehído, el cual está compuesto de glutaraldehído diluido al 2,5% con buffer sódico. Las muestras tienen una fijación mínima de 24 horas a 4°C antes de iniciar la tinción en bloque.

2. Tinción en bloque: Una vez fijadas las muestras, serán lavadas en buffer Veronal por 15 minutos, luego se realizará una post-fijación y tinción en bloque con Tetróxido de Osmio al 1% por 1hrs a 4°C (el Tetróxido de Osmio es un fijador clásico de ME preserva las lipoproteínas del tejido las cuales se tornan de un color negro característico). Le sigue un lavado en agua destilada de 15 minutos y después una solución de Acetato de Uranilo acuoso por 1 hora a 4°C.

3. Deshidratación e impregnación: La deshidratación del tejido se realiza en Acetona a diferentes concentraciones que van desde 20%; 35%; 50% ; 70% ; 85% y 95% en estaciones de 10 minutos cada una, luego se tratan con acetona 100% en 3 cambios de 15 minutos cada uno. Finalmente, las muestras se dejarán impregnando toda la noche en una mezcla de EPON-Acetona en proporción 1:1.

4. Inclusión en EPON: Se utilizarán moldes (plantillas) de inclusión de polipropileno, se procederá a depositar el papel con el número de biopsia y de inclusión respectiva en el fondo del molde. Se procederá luego a vaciar la mezcla de Epon (resina) en los moldes de inclusión. (La mezcla de EPON que es preparada con antelación, debe presentar una consistencia muy homogénea, la cual se obtiene al agitar la mezcla por un tiempo mínimo de 12 minutos y puesto en una campana de vacío por media hora).

Se depositará la cantidad necesaria de mezcla de EPON para llenar el molde, teniendo la extrema preocupación de eliminar todas las burbujas que se forman en el fondo de la inclusión. Posteriormente, se introducirá el tejido en el borde de

extremo correspondiente, sumergiéndolo. (las muestras bajan por gravedad en aproximadamente 1 hora).

Una vez que todas las muestras sometidas a proceso de inclusión hayan alcanzado la posición y orientación deseada dentro de la inclusión, se procederá a rotular cada muestra en el molde con el código ME.

Los moldes, con el contenido de las muestras, serán llevadas a la estufa a 37°C durante 1 hora para la polimerización. Luego, en una estufa a 80°C por 2 horas. Y finalmente, en la misma estufa de 80°C durante 2 días.

5. Corte Semifino y Fino: Para hacer los cortes semifinos de microscopia electrónica, se montará la inclusión de resina en un portainclusión sobre el soporte del ultramicrotomo. Los bloques serán tallados eliminando el exceso de resina. El espécimen será montado en el ultramicrotomo y con un cuchillo de cristal ultramicrotome glass strips ted pella inc, fabricada en la máquina para hacer navajas cuchillos (700, LKB), se realizarán los cortes semifinos de 1 a 1,4 μ , serán colocados sobre un porta objeto en una gota de agua los cuales serán secados en una platina caliente y teñidos con azul de toluidina.

Se observará el corte semifino en el microscopio óptico con el médico anatomopatólogo para ubicar la zona útil para efectuar el corte ultrafino. Este proceso se repetirá desgastando la muestra las veces que sea necesario, que incluye desgaste de las otras inclusiones del mismo caso.

Una vez ubicada la zona deseada se procederá al corte fino.

Corte Fino: Se tallará una pirámide truncada en el extremo de la inclusión para que quede solo el área seleccionada en el corte semifino, este proceso se repetirá hasta disponer del total de inclusiones que serán cortadas en el ultramicrotomo con cuchilla e diamante para corte ultrafino.

Este se realizará en forma automática en el ultramicrotomo, con cuchillo de diamante (edge length 4mm, inc 4° and setting 4°). Los cortes serán de un espesor de 400Å a 600 Å (color plateado hasta amarillo rojo); se recolectarán por flotación en el baño que trae integrado el cuchillo de diamante, el cual será llenado con agua bidestilada hasta formar un espejo de plata en la superficie. Los cortes serán recolectados en número variable según tamaño de la superficie de corte tallada en cada muestra, con un promedio de 20 a 30 cortes. Estos se montarán sobre una grilla de cobre flameada para reducir la estática de 300 mesh (se montarán dos grillas para cada caso, las que serán depositadas en placas de Petri de plástico con 4 compartimientos sobre papel filtro, con el debido rotulo de numero de biopsia). Las grillas deberán ser manipuladas cuidadosamente con una pinza self-closing.

6. Tinción de Grillas: La tinción de grillas se realizará en un ambiente limpio. El tecnólogo médico usará mascarilla como medida de protección. La tinción consiste en agregar sales de metales pesados sobre el tejido, para lavar se utiliza agua bidestilada hervida y tibia. Las grillas serán manipuladas con pinzas self-closing.

Las grillas serán sumergidas en solución de acetato de uranilo al 4% en metanol, por 90 segundos el cual será filtrado al momento de usar. Lavado en una solución de metanol acetona 1:1, seguido de un lavado en agua bidestilada al chorro, afirmando la grilla con la pinzas self-closing, las grillas serán dejadas en la capsula de Petri nuevamente.

Las grillas serán teñidas con solución de Reynolds, para lo cual se ubicará granallas de hidróxido de sodio en uno de los compartimientos de una capsula de Petri con 4 divisiones, para mantener el ambiente de tinción libre de humedad. En el resto de los compartimientos se pondrán trozos cortados de papel parafilm sobre los que irán dos gotas de la solución de tinción con una pipeta Pasteur de vidrio (la solución de Reynolds se obtiene atravesando con cuidado la vaselina que la protege por esto se debe tener la precaución de quebrar, posteriormente, la punta de la pipeta que estuvo en contacto con la vaselina). Las grillas serán depositadas con cuidado suspendidas en las gotas de la solución de tinción con la cara que están los cortes mirando la gota de tinción y se dejarán teñir por 10 minutos. Luego se procederá al lavado con agua bidestilada al chorro e inmersiones en metanol puro (2 o 3 cambios) para arrastrar posibles precipitados que puedan tener las grillas.

Después del proceso de tinción, las grillas se almacenarán y/o transportarán en portagrillas plásticos. Se entregan al patólogo encargado de su examen en el microscopio electrónico.

La tinción usada es una tinción positiva, que aumenta el contraste del tejido biológico, debido al incremento de la dispersión de los elementos del haz primario

que incide sobre la muestra. El acetato de Uranilo tiñe específicamente estructuras que contienen ácidos nucleicos. El citrato de plomo tiñe membranas, glicógeno, ribosomas y varios componentes tisulares. Además de intensificar la tinción de Uranilo.

Conteo de axones

El número de axones no se valorará directamente ante la imposibilidad de segmentarlas de forma individual por el contacto íntimo entre la mayoría de ellas. Con todas las funciones descritas se elaborará un conjunto de funciones preprogramadas.

Como la mayoría de los autores, se realizarán mediciones solo en las secciones de cada nervio que seleccionamos, porque *a priori* pueden ofrecer más información. Así, se escogerán los segmentos del cabo proximal y del cabo distal; coinciden con las dos secciones de cortes semifinos e inclusión en parafina para tinción en azul de toluidina. Se valorará un mínimo de 100.000 g cuadradas de nervio ciático por sección mediante el estudio de sucesivas imágenes. El proceso de análisis de imagen se completará con el cálculo del número de fibras nerviosas por 100 ii cuadradas de nervio ciático, de la siguiente manera:

Se realizará una foto de 5x con el microscopio de luz, para calcular la superficie de nervio de cada sección y animal, con la ayuda del programa para Windows Image®, y el programa para AutoCAD 3D® para Macintosh.

Luego, se rastreará cada preparación con el aumento de 100, captando fotos sucesivas de cada una de las regiones de la sección nerviosa en concreto.

Se seleccionarán, de estas, diez imágenes al azar.

Se cuantificarán los axones de esas diez imágenes.

Se calculará el cómputo total de axones y la densidad de los mismos, para lo cual se extrapolará la suma de los axones contados en los diez campos, con el número de campos por 100 aumentos de esa preparación, al haberla medido previamente en 5 aumentos.³⁶

Análisis estadístico

Los valores serán expresados como media \pm DS. El test de t de Student pareado será usado para la comparación del tiempo. Las diferencias entre dos grupos serán medidas mediante el test de t de Student para muestras independientes. Diferencias entre más de dos grupos serán medidas mediante el análisis de varianza. El test HSD de Tukey será utilizado para comparaciones múltiples. El análisis será realizado utilizando SPSS. Valores de $p < 0.05$ serán considerados estadísticamente significativos.

4.5 Aspectos éticos

Las veinticuatro ratas utilizadas en el experimento serán ratas albinas Holtzman de entre 300 g y 400 g de peso, adquiridas en el Instituto Nacional de Salud (INS). El manejo de los animales de experimentación será siguiendo el Protocolo

Experimental para Trabajos con Animales, del Bioterio Central de la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales de la Universidad de Buenos Aires (anexo 1), el cual contiene los requisitos para la solicitud de elaboración de proyectos de la Directiva 2010/63/UE (anexo 2) y las recomendaciones para el contenido de los Protocolos de la Guide for the Care and Use of Laboratory Animals, 8th Ed., NRC, USA (anexo 3).

CRONOGRAMA

Pasos	2018							2019			
	Junio	Julio	Agosto	Septiembre	Octubre	Noviembre	Diciembre	Enero	Febrero	Marzo	Abril
Redacción final del proyecto de investigación	X										
Aprobación del proyecto de investigación		X									
Recolección de datos			X	X	X						
Procesamiento y análisis de datos						X					
Elaboración del informe							X				
Correcciones del trabajo de investigación								X	X		
Aprobación del trabajo de investigación										X	
Publicación del artículo científico											X

PRESUPUESTO

Concepto	Monto estimado (soles)
Insumos y materiales	8500.00
Recursos humanos especializados	1000.00
Empastado de la tesis	100.00
Transcripción	500.00
Impresiones	200.00
Logística	300.00

Refrigerio y movilidad	200.00
Total	10 800.00

FUENTES DE INFORMACIÓN

1. Noble J, Munro CA, Prasad VS, Midha R. Analysis of upper and lower extremity peripheral nerve injuries in a population of patients with multiple injuries. J Trauma; 45:116-122. [Internet]. Extraído el 16 de febrero de 2017. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9680023>

2. Scheib J, Höke A. Advances in peripheral nerve regeneration. *Nat Rev Neurol*; 9:668-676. [Internet] 2013. Extraído el 5 de noviembre de 2017. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4496772/>
3. Bosse F. Extrinsic cellular and molecular mediators of peripheral axonal regeneration. *Cell Tissue Res*; 349:5-14. [Internet] 2012. Extraído el 5 de octubre de 2017. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5343799/>
4. Fu SY, Gordon T. Contributing factors to poor functional recovery after delayed nerve repair: prolonged axotomy. *J Neurosci*; 15:3876-3885. [Internet] 1995. Extraído el 20 de mayo de 2018. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4446033/>
5. Terenghi G, Hart A, Wiberg M. The nerve injury and the dying neurons: diagnosis and prevention. *J. Hand Surg Eur*; 36:730-734. [Internet] 2011. Extraído el 16 de febrero de 2017. Disponible en: <http://journals.sagepub.com/doi/abs/10.1177/1753193411422202>
6. Gordon T, Treyman N, Raji A. The basis for diminished functional recovery after delayed peripheral nerve repair. *J Neurosci*. 2011; 31:5325-5334.
7. Jonsson S, Wiberg R, McGrath AM, Novikov LN, Wiberg M, Novikova LN, Kingham PJ. Effect of delayed peripheral nerve repair on nerve regeneration, Schwann cell function and target muscle recovery. *PLoS One*; 8:e56484.

- [Internet] 2013. Extraído el 6 de agosto de 2017. Disponible en:
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23409189>
8. Welin D, Novikova LN, Wiberg M, Kellerth JO, Novikov LN. Survival and regeneration of cutaneous and muscular afferent neurons after peripheral nerve injury in adult rats. *Exp Brain Res*; 186:315-323. [Internet] 2008. Extraído el 16 de febrero de 2017. Disponible en:
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18057922>
9. Oppenheimer RQ, Yin QW, Prevet D, et al. Brain-derived neurotrophic factor rescues developing avian motoneurons from cell death. *Nature*; 1992, 360:755-757.
10. Liu X, Sun Y, Li H, Li Y, Li M, Yuan Y, Cui S, Yao D. Effect of Spp1 on nerve degeneration and regeneration after rat sciatic nerve injury. *BMC Neurosci*; 18:30. [Internet] 2017. Extraído el 7 de septiembre de 2017. Disponible en:
http://www.academia.edu/3615768/BDNF_and_NT3_but_not_NGF_Prevent_Axotomy-induced_Death_of_Rat_Corticospinal_Neurons_In_Vivo
11. Gong L, et al. The effects of claudin 14 during early Wallerian degeneration after sciatic nerve injury. *Neural Regen Res*; 9:2151–2158. [Internet] 2014. Extraído el 4 de febrero de 2017. Disponible en:
<http://www.nrronline.org/article.asp?issn=1673-5374;year=2014;volume=9;issue=24;spage=2151;epage=2158;aulast=Gong>

12. Yu H, et al. ERK1/2 and AKT are vital factors in regulation of the migration of rat Schwann cells. *J Vet Med Sci*; 77:427–432. [Internet] 2015. Extraído el 9 de febrero de 2017. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5349802/>
13. Parrinello S, Napoli I, Ribeiro S, Wingfield Digby P, Fedorova M, Parkinson DB, Doddrell RD, Nakayama M, Adams RH, Lloyd AC. EphB signaling directs peripheral nerve regeneration through Sox2-dependent Schwann cell sorting. *Cell*; 143:145–155. [Internet] 2010. Extraído el 17 de marzo de 2018. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4484967/>
14. Zochodne DW. The challenges and beauty of peripheral nerve regrowth. *J Peripher Nerv Syst*; 17:1–187. [Internet] 2012. Extraído el 17 de marzo de 2018. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4212066/>
15. Cattin AL, Burden JJ, Van Emmenis L, Mackenzie FE, Hoving JJ, Garcia Calavia N, Guo Y, McLaughlin M, Rosenberg LH, Quereda V, Jamecna D, Napoli I, Parrinello S, Enver T, Ruhrberg C, Lloyd AC. Macrophage-induced blood vessels guide schwann cell-mediated regeneration of peripheral nerves. *Cell*. 2015; 162:1127–1139.
16. Yu W, Wang J, Yin J. Platelet-rich plasma: a promising product for treatment of peripheral nerve regeneration after nerve injury. *Int J Neurosci* 2011;121:176-80. [Internet] 1998. Extraído el 17 de marzo de 2018.

Disponible en: <http://aott.org.tr/files/journals/1/articles/2861/public/2861-3650-1-PB.pdf>

17. Emel E, Ergün SS, Kotan D, Gürsoy EB, Parman Y, Zengin A, et al. Effects of insulin-like growth factor-I and platelet-rich plasma on sciatic nerve crush injury in a rat model. *J Neurosurg*; 114:522-8. [Internet] 2011. Extraído el 16 de febrero de 2017. Disponible en: [https://www.worldneurosurgery.org/article/S1878-8750\(17\)30863-X/references](https://www.worldneurosurgery.org/article/S1878-8750(17)30863-X/references)
18. Cho HH, Jang S, Lee SC, Jeong HS, Park JS, Han JY, et al. Effect of neural-induced mesenchymal stem cells and platelet-rich plasma on facial nerve regeneration in an acute nerve injury model. *Laryngoscope* 2010; 120:907-13.
19. Shirley DM, Williams SA, Santos PM. Brain-derived neurotrophic factor and peripheral nerve regeneration: a functional evaluation. *Laryngoscope*. 1996; 106:629-632. [Internet] 1998. Extraído el 22 de enero de 2018. Disponible en: <http://journals.sagepub.com/doi/10.1016/S0266-7681%2898%2980117-4>
20. Tohill m, Mantovani C, Wiberg M, et al. Rat bone marrow mesenchymal stem cells express glial markers and stimulate nerve regeneration. *Neurosci Lett*. 2004; 362:200-203. [Internet] 1998. Extraído el 22 de enero de 2018. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5620423/>

21. Cho HH, Lee SC, Jang SJ, et al. Effect of platelet rich plasma on facial nerve regeneration in acute nerve injury model. *Korean J Otorhinolaryngol Head Neck Surg.* 2008; 51:422-428.
22. Küçük L, Günay H, Erbas O, Küçük Ü, Atamaz F, Coskunol E. Effects of platelet-rich plasma on nerve regeneration in a rat model. *Acta Orthop Traumatol Turc.* 2014; 48(4):449-454.
23. Zhou H, Beevers CS, Huang S. The targets of curcumin. *Curr. Drug Targets.* 2011; 12:332–347. [Internet] 1998. Extraído el 10 de febrero de 2018. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3638063/>
24. Park SY, Kim HS, Cho EK, Kwon BY, Phark S, Hwang KW, Sul D. Curcumin protected PC12 cells against beta-amyloid-induced toxicity through the inhibition of oxidative damage and tau hyperphosphorylation. *Food Chem. Toxicol.* 2008; 46:2881–2887. [Internet] 1998. Extraído el 28 de febrero de 2017. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18573304>
25. Wang R, Li YB, Li YH, Xu Y, Wu HL, Li XJ. Curcumin protects against glutamate excitotoxicity in rat cerebral cortical neurons by increasing brain-derived neurotrophic factor level and activating TrkB. *Brain Res.* 2008; 1210:84–91.
26. Zhao J, Yu S, Zheng W, Feng G, Luo G, Wang L, Zhao Y. Curcumin improves outcomes and attenuates focal cerebral ischemic injury via antiapoptotic mechanisms in rats. *Neurochem. Res.* 2010; 35:374–379.

27. Lin MS, Lee YH, Chiu WT, Hung KS. Curcumin provides neuroprotection after spinal cord injury. *J. Surg. Res.* 2011; 166:280–289.
28. Ma J, Liu J, Yu H, Wang Q, Chen Y, Xiang L. Curcumin promotes nerve regeneration and functional recovery in rat model of nerve crush injury. *Neurosci Lett.* 2013; 547:26-31. [Internet] 1998. Extraído el 20 de octubre de 2017. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23669643>
29. Manolova Y, Deneva V, Antonov L, Drakalska E, Momekova D, Lambov N. The effect of the water on the curcumin tautomerism: a quantitative approach. *Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc.* 2014 Nov 11; 132:815-20.
30. Tuncel U, Kostakoglu N, Turan A, Çevik B, Çaylı S, Demir O, Elmas C. The Effect of Autologous Fat Graft with Different Surgical Repair Methods on Nerve Regeneration in a Rat Sciatic Nerve Defect Model. *Plast Reconstr Surg.* 2015;136 (6):1181-91. [Internet] 1998. Extraído el 20 de octubre de 2017. Disponible en: <https://scholar.google.com.tr/citations?user=WVQATeMAAAAJ&hl=tr>
31. Ozkan N, Kayaoglu HA, Ersoy OF, Celik A, Kurt GS, Arabaci E. Effects of two different meshes used in hernia repair on nerve transport. *J Am Coll Surg.* 2008; 207:670–675.
32. Monte-Raso VV, Barbieri CH, Mazzer N, Yamasita AC, Barbieri G. Is the Sciatic Functional Index always reliable and reproducible? *J Neurosci*

Methods. 2008; 170:255–261. [Internet] 1998. Extraído el 13 de febrero de 2017. Disponible en: <http://tede2.pucrs.br/tede2/bitstream/tede/1549/1/419178.pdf>

33. De Medinaceli L, Freed WJ, Wyatt RJ. An index of the functional condition of rat sciatic nerve based on measurements made from walking tracks. *Exp Neurol*. 1982 Sep; 77(3):634-43.
34. Preston DC, Shapiro BE. Basic Nerve conduction studies. *Electromyography and neuromuscular disorders*. 2 ed. PhiladelphiaUSA: Elsevier; 2005. 30-32 p.
35. Preston DC, Shapiro BE. Basic Electromyography. *Electromyography and neuromuscular disorders*. 2 ed. PhiladelphiaUSA: Elsevier; 2005. 231-235, 246-250 p.
36. García Medrano B, Barrio Sanz P, Simón Pérez C, León Andrino A, Garrosa García M, Martín Ferrero MA, Gayoso Rodríguez MJ. Regeneración de las lesiones críticas del nervio periférico con factores de crecimiento. Estudio experimental. *Rev Esp Cir Ortop Traumatol*. 2013 May-Jun;57(3):162-9.
37. Manolova Y, Deneva V, Antonov L, Drakalska E, Momekova D, Lambov N. The effect of the water on the curcumin tautomerism: a quantitative approach. *Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc*. 2014 Nov 11;132:815-20. [Internet] 1998. Extraído el 15 de mayo de 2018. Disponible en:

https://books.google.com.pe/books?id=VH9BDAAAQBAJ&pg=PA30&lpg=PA30&dq=37.%09Manolova+Y,+Deneva+V,+Antonov+L,+Drakalska+E,+Momekova+D,+Lambov+N.+The+effect+of+the+water+on+the+curcumin+tautomerism:+a+quantitative+approach.+Spectrochim+Acta+A+Mol+Biomol+Spectrosc.&source=bl&ots=ljJK47ZPPx&sig=g_7sSI35KGwZPE9V6jdg0VBV1d0&hl=es&sa=X&ved=0ahUKEwj1y9fz5_fbAhUG0VMKHRYrBigQ6AEIJzAA#v=onepage&q=37.%09Manolova%20Y%2C%20Deneva%20V%2C%20Antonov%20L%2C%20Drakalska%20E%2C%20Momekova%20D%2C%20Lambov%20N.%20The%20effect%20of%20the%20water%20on%20the%20curcumin%20tautomerism%3A%20a%20quantitative%20approach.%20Spectrochim%20Acta%20A%20Mol%20Biomol%20Spectrosc.&f=false

38. Liu GM, Xu K, Li J, Luo YG. Curcumin upregulates S100 expression and improves regeneration of the sciatic nerve following its complete amputation in mice. Neural Regen Res. 2016 Aug; 11(8): 1304–1311.
39. Zhou H, Beevers CS, Huang S. The targets of Curcumin. Curr Drug Targets. 2011 Mar 1;12(3):332-47. [Internet] 1998. Extraído el 15 de mayo de 2018. Disponible en: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?db=pubmed&cmd=link&linkname=pubmed_pubmed&uid=23281076
40. Li R, Liu Z, Pan Y, Chen L, Zhang Z, Lu L. Peripheral nerve injuries treatment: a systematic review. Cell Biochem Biophys. 2014 Apr; 68(3):449-54.

41. Gu, X., Ding, F., Yang, Y., & Liu, J. (2011). Construction of tissue engineered nerve grafts and their application in peripheral nerve regeneration. *Progress in Neurobiology*, 93(2), 204–230. [Internet] 1998. Extraído el 15 de mayo de 2018. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4745297/>
42. Ohta, M., Suzuki, Y., Chou, H., Ishikawa, N., Suzuki, S., Tanihara, M., et al. (. Novel heparin/alginate gel combined with basic fibroblast growth factor promotes nerve regeneration in rat sciatic nerve. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, 71(4), 661–668. [Internet] 2004. Extraído el 23 de marzo 2018. Disponible en: [https://www.ncbi.nlm.nih.gov/CBBresearch/Lu/Demo/PubTator/curator_mention.cgi?user=User720791406&pmid=15505831&searchtype=PubMed_Search&query=24188561\[relatedto\]&page=2&Species_display=1&Gene_display=1&Chemical_display=1&stres_display=1&Disease_display=1&snp_display=1&Mutation_display=1&tax=](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/CBBresearch/Lu/Demo/PubTator/curator_mention.cgi?user=User720791406&pmid=15505831&searchtype=PubMed_Search&query=24188561[relatedto]&page=2&Species_display=1&Gene_display=1&Chemical_display=1&stres_display=1&Disease_display=1&snp_display=1&Mutation_display=1&tax=)

ANEXOS

1. Matriz de consistencia

Título	Pregunta de Investigación	Objetivos	Hipótesis	Tipo y diseño de estudio	Población de estudio y procesamiento de datos	Instrumento de recolección de datos
Plasma rico en plaquetas y curcumina en regeneración axonal de lesiones agudas del nervio ciático en ratas Instituto Nacional de Salud del Niño 2017	¿La administración local de plasma rico en plaquetas y la intraperitoneal de curcumina mejora la regeneración axonal en lesiones agudas reparadas del nervio ciático en ratas, en el Instituto Nacional de Salud del Niño, en 2017?	<p>General Determinar si la administración local de plasma rico en plaquetas (PRP) y/o la administración intraperitoneal de curcumina mejora la regeneración axonal en lesiones agudas reparadas del nervio ciático en ratas en el Instituto Nacional de Salud del Niño, en 2017.</p> <p>Específicos Verificar si la administración local de plasma rico en plaquetas (PRP) y/o la administración intraperitoneal de curcumina muestra mejores resultados en la evaluación funcional de reinervación (Sciatic Functional Index – SFI) en lesiones agudas reparadas del nervio ciático en ratas.</p>	<p>Hi: El plasma rico en plaquetas, administrado localmente, y la curcumina, administrada intraperitonealmente, por un período de 12 semanas, mejoran la regeneración axonal en lesiones agudas reparadas del nervio ciático en ratas.</p> <p>H0: El plasma rico en plaquetas administrado localmente y la curcumina administrada intraperitonealmente, por un período de 12 semanas, no mejoran la regeneración axonal en lesiones agudas reparadas del nervio ciático en ratas.</p>	<p>Tipo y diseño Estudio experimental: ensayo clínico.</p>	<p>Población de estudio Ratas Albinas Holtzman hembras de entre 200 y 300 g.</p> <p>Tamaño de la muestra 24 ratas.</p> <p>Muestreo Por conveniencia</p> <p>Procesamiento de datos Preparación del plasma rico en plaquetas</p> <p>Métodos experimentales</p>	<p>Ficha de recolección de datos</p> <p>Protocolo experimental para trabajos con animales</p> <p>Clasificación de la severidad de los procedimientos</p> <p>Guía para el cuidado y manejo de animales de laboratorio</p>

		<p>Establecer si la administración local de plasma rico en plaquetas (PRP) y/o la administración intraperitoneal de curcumina muestra mejores resultados en el estudio electromiográfico y de neuroconducción de lesiones agudas reparadas del nervio ciático en ratas.</p> <p>Determinar si la administración local de plasma rico en plaquetas (PRP) y/o la administración intraperitoneal de curcumina muestra un aumento en el número de axones a la evaluación histológica de lesiones agudas reparadas del nervio ciático en ratas.</p>				
--	--	---	--	--	--	--

2. Instrumento de recolección de datos

FICHA DE RECOLECCIÓN DE DATOS

Código de rata: _____

Fecha de cirugía: _____

1. Índice funcional del ciático:

2. Evaluación neurofisiológica:

Neuroconducción:

Basal: _____ milivoltios

2 semanas: _____ milivoltios

12 semanas: _____ milivoltios

3. Evaluación histológica:

Número de axones: _____

4. Otros hallazgos:

Fecha: _____

3. Protocolo experimental para trabajos con animales

UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales
Bioterio Central

PROTOCOLO N°000/20__

Modificación:00/00/00

Cátedra/Laboratorio/ Servicio/Otro:

Título del proyecto:

Datos del investigador responsable: (IR)

- Nombre y Apellido:
- Título:
- Experiencia y/o capacitación (para el procedimiento a ser usado)
- Instituto / Universidad / Empresa:
- Departamento o Cátedra:

- Teléfono:
- Teléfono auxiliar:
- Correo electrónico:
- Fax:

Datos del personal que realizara el protocolo

- Nombre y Apellido:
- Título:
- Tarea a realizar durante el protocolo (roles y responsabilidades)
- Capacitación, entrenamiento y experiencia (certificados y/o registrados)
- Teléfono:
- Teléfono auxiliar
- Correo electrónico:

Definiciones: Aplicable a siglas, abreviaturas, marcas, palabras de significado dudoso o infrecuentes, etc. En caso de que no sea necesario se colocará “no aplicable”.

Objetivo de los experimentos: (Acompañar en Anexo Proyecto Completo y Resumido)

Fecha de inicio de los experimentos:

Fecha de finalización de los experimentos:

Racionalidad y propósito del proyecto, sus beneficios científicos o valor docente previsto:

Datos de los animales (con justificación)

- Género/ Especie / Cepa / Raza seleccionada:
- Origen de los animales
- Cantidad:(por experimento)
- Sexo:
- Edad:(rango)
- Peso:(rango)

Justifique el uso del modelo animal frente a métodos alternativos de reemplazo, refinamiento y/o reducción del número de animales:

Justifique el tamaño de la muestra (estadísticamente o por otros criterios):

Declaración de que el procedimiento no es una duplicación de otros ya realizados:

En caso de tratarse de pequeños roedores de laboratorio (rata/ratón/hámster/gerbil) indicar su condición microbiológica (convencionales/ libres de patógenos específicos), para evaluar sus efectos sobre la investigación:

Alojamiento de los animales:

- Individuos alojados por jaula:
- Tipo de jaula:
- Sala de alojamiento:
- Condiciones de Alojamiento:
- Tipo de dieta:
- Tipo de agua de bebida:
- Cama o lecho:
- Ventilación:
- Temperatura:
- Humedad:
- Iluminación:
- Rutina de limpieza:
- Aclaraciones:

Procedimiento: Realice una descripción detallada, clara, concisa y secuencial de los procedimientos experimentales a los que serán sometidos los animales:

Instrucciones para el personal técnico del Bioterio Central FCEN UBA a cargo del cuidado de los animales. (marque con una X)

Animales enfermos

Animales muertos

Problemas técnicos

Llamar al investigador

Llamar al investigador

Llamar al investigador

Sacrificar los animales

Descartar como residuos
patogénicos

Otros: (especificar instrucción)

Uso de agentes peligrosos

Indique (con una X) si los agentes que utiliza son:

- Infecciosos
- Radioisótopos
- Carcinógenos
- Tóxicos químicos
- Vectores virales
- Animales modificados genéticamente

- Animales silvestres
- Animales experimentales con sustancias tóxicas
- Animales experimentales con material radiactivo
- Animales experimentales con material infeccioso
- Otros agentes peligrosos

Indique (con una X) cuales de los Procedimientos detallados abajo se emplearan en este proyecto:

- Restricción de agua y alimentos (acceso solo a tiempo controlado o restricción de volumen / peso consumido)
- Cateterización , extracción de sangre, intubación
- Modificación de conducta
- Procedimientos quirúrgicos con recuperación
- Procedimientos quirúrgicos sin recuperación
- Estudios LD50
- Restricción prolongada (equipo utilizado, tamaño, diseño y operación para disminuir disconfor, dolor, diestres y potenciales lastimaduras)
- Producción de anticuerpos monoclonales
- Producción de anticuerpos policlonales
- Otros (especificar):

Clasifique según su opinión la SEVERIDAD de los Procedimientos (Ver Anexo 2 para orientación)

- Sin recuperación
- Leve
- Moderado
- Severo

Indique los agentes y la bibliografía de referencia que utilizará para evitar el dolor o sufrimiento innecesario en los animales.

Especie	Agente a utilizar	Dosis (mg/kg)	Vía de Administración	Frecuencia de Administración.

Indique qué parámetros medirá para conocer si el resultado de la anestesia es el correcto.

En caso de no utilizar ningún tratamiento paliativo al sufrimiento del animal, justifique detalladamente su decisión.

Conducción de los procedimientos quirúrgicos

Describa cuidados y observaciones pre y posoperatorios (incluye asepsia o esterilidad, mantenimiento de la temperatura corporal, reposición de fluidos, etc.)

¿Al finalizar su protocolo de forma parcial o total, posibilita el uso de los animales con otro fin compatible? Explique brevemente su opinión.(Directiva 2010/63EU,Artículo 16) Reutilización de animales

Finalización del protocolo

Indique y justifique los criterios de punto final seleccionados.

Explique el destino de los animales luego de finalizar el protocolo

- Eutanasia
- Reutilización
- Protocolo de supervivencia

En caso de que el destino fuera la eutanasia detalle:

- a) Método eutanásico:
- b) Justificación del método:
- c) Persona a cargo de la realización de la maniobra:
- d) Criterios y proceso de intervención, oportuna remoción del animal de estudio o eutanasia si se anticipan circunstancias dolorosas o estresantes

Riesgos para el personal o para la población animal del Bioterio:

- Sin riesgo
- Riesgo potencial (describir)

Medidas para disminuir el riesgo:

Personas a contactar en caso de emergencia fuera de horario:

Nombre:

Telf:

Correo electrónico:

Nombre:

Telf:

Correo electrónico:

Compromiso para el cuidado uso ético de los animales de laboratorio.

Declaro haber leído y completado el presente formulario, comprometiéndome a cumplir y hacer cumplir mi protocolo de investigación de acuerdo con los principios éticos del manejo de animales de experimentación.

Asimismo, me comprometo a educar al personal a mi cargo y exigirles el respeto de estos principios y de los aspectos relacionados con el cuidado y uso de animales de laboratorio detallados en los documentos: "Guide for the Care and Use of Laboratory Animals", 8th Edition, National Research Council, The National Academies Press, Washington DC, 8va edición 2010 y Directiva 2010/63/UE del

Parlamento Europeo relativa a la protección de los animales utilizados para fines científicos.

Nombre del investigador principal:

Título académico:

Fecha:

Firma:

4. Clasificación de la severidad de los procedimientos

(Directiva 2010/63/UE)

La severidad de un procedimiento irá determinada por el grado de dolor, sufrimiento, angustia o daño duradero que se prevé que experimente un animal individual durante el procedimiento.

Sección I: Categorías de severidad

No recuperación:

Los procedimientos que se realizan enteramente bajo anestesia general tras la cual el animal no recuperará la conciencia deben clasificarse como de no recuperación.

Leve:

Los procedimientos en animales a consecuencia de los cuales es probable que experimenten dolor, sufrimiento o angustia leves de corta duración, así como los

procedimientos sin alteración significativa del bienestar o del estado general de los animales deben clasificarse como leves.

Moderado:

Los procedimientos en animales a consecuencia de los cuales es probable que experimenten dolor, sufrimiento o angustia moderados de corta duración, o leves pero duraderos, así como los procedimientos que pudieran causar una alteración moderada del bienestar o el estado general de los animales deben clasificarse como moderados.

Severo:

Los procedimientos en animales a consecuencia de los cuales es probable que experimenten dolor, sufrimiento o angustia intensos, o moderados pero duraderos, así como los procedimientos que pudieran causar una alteración grave del bienestar o del estado general de los animales deben clasificarse como severos.

Sección II: Criterios de atribución

La atribución de la categoría de severidad tendrá en cuenta cualquier intervención o manipulación de un animal en un procedimiento determinado. Se basará en los efectos más severos que pueda experimentar un animal después de aplicar todas las técnicas apropiadas de refinamiento.

Al atribuir un procedimiento a una categoría particular, el tipo de procedimiento y demás factores se tendrán en cuenta. Todos estos factores deben considerarse caso por caso.

Los factores relativos al procedimiento deben incluir:

- el tipo de manipulación, el tratamiento,
- la naturaleza del dolor, sufrimiento, angustia o daño duradero causados por (todos los elementos de) el procedimiento, y su intensidad, duración y frecuencia y la multiplicidad de técnicas empleadas,
- el sufrimiento acumulativo en un procedimiento,
- la prevención de la expresión del comportamiento natural incluidas las restricciones en las normas de alojamiento, zootécnicas y de cuidado de los animales.

En la sección III se facilitan ejemplos de procedimientos atribuidos a cada categoría de severidad sobre la base de los factores relativos al tipo de procedimiento de que se trate. Facilitarán la primera indicación sobre la clasificación que sería la más adecuada para un determinado tipo de procedimiento. Sin embargo, a efectos de la clasificación final de severidad del procedimiento, se tendrán en cuenta los siguientes factores adicionales, evaluados caso por caso:

- tipo de especie y genotipo,
- madurez, edad y sexo del animal,
- experiencia de formación del animal en el procedimiento,
- si se reutiliza el animal, la severidad real de los procedimientos anteriores,
- los métodos utilizados para reducir o suprimir el dolor, el sufrimiento y la angustia, incluidos refinamiento de condiciones de alojamiento, zootécnicas y de cuidado de los animales,
- uso de puntos finales incruentos.

Sección III: Ejemplos de diversos tipos de procedimiento atribuidos a cada categoría de severidad sobre la base de los factores relativos al tipo de procedimiento

1. Leve:

- a) Administración de anestesia, salvo para el único propósito de sacrificar;
- b) Estudio farmacocinético donde se administra una única dosis y se recoge un número limitado de muestras de sangre (totalizando < 10 % del volumen circulante) y no se prevé que la sustancia cause ningún efecto nocivo perceptible;
- c) Técnicas no invasivas de diagnóstico por imagen en animales (por ejemplo resonancia magnética) con la sedación o la anestesia apropiadas;
- d) Procedimientos superficiales, por ejemplo biopsias de oreja y rabo, implantación subcutánea no quirúrgica de minibombas y transpondedores;
- e) Aplicación de dispositivos exteriores de telemetría que únicamente causan al animal un debilitamiento menor o una interferencia menor con la actividad y el comportamiento normales;
- f) Administración de sustancias por vía subcutánea, intramuscular, intraperitoneal, por sonda gástrica e intravenosa a través de los vasos sanguíneos superficiales, donde la sustancia solo tiene un efecto leve en el animal, y los volúmenes se encuentran dentro de límites apropiados para el tamaño y la especie del animal;
- g) Inducción de tumores, o tumores espontáneos, que no causan ningún efecto nocivo clínico perceptible (por ejemplo, nódulos pequeños, subcutáneos, no invasivos);

- h) Cría de animales genéticamente modificados que se prevé que dé lugar a un fenotipo con efectos leves;
- i) Alimentación con dietas modificadas, que no cubren las necesidades nutricionales de todos los animales y se prevé que causen una anomalía clínica leve en el período de estudio;
- j) Confinamiento a corto plazo (< 24 h) en jaulas metabólicas;
- k) Estudios que implican la privación a corto plazo de interlocutores sociales, enjaulado solitario a corto plazo de ratas o ratones adultos de cepas gregarias;
- l) Modelos que exponen al animal a estímulos nocivos que se asocian brevemente con dolor, sufrimiento o angustia leve, y que el animal puede evitar;
- m) Una combinación o una acumulación de los siguientes ejemplos puede dar lugar a una clasificación leve:
 - i. Evaluación de la composición corporal a través de mediciones no invasivas y restricción mínima,
 - ii. Supervisión ECG con técnicas no invasivas con una restricción mínima o nula de animales habituados,
 - iii. Aplicación de dispositivos exteriores de telemetría que no se prevé que causen ningún impedimento a animales socialmente adaptados y que no interfieren con la actividad y el comportamiento normales,
 - iv. Cría de animales genéticamente modificados que no se espera que tengan ningún fenotipo adverso clínicamente perceptible,
 - v. Adición a la dieta de marcadores inertes para seguir el paso de la digesta,

- vi. Retirada de la alimentación durante un período inferior a 24h en ratas adultas,
- vii. Ensayos en campo abierto.

2. Moderado:

- a) Aplicación frecuente de sustancias de prueba que producen efectos clínicos moderados, y extracción de muestras de sangre (> 10 % de volumen circulante) en un animal consciente en el plazo de algunos días sin reemplazo del volumen;
- b) Estudios de determinación de la gama de dosis causante de toxicidad aguda, pruebas de toxicidad crónica/carcinogenicidad, con puntos finales no letales;
- c) Cirugía bajo anestesia general y analgesia apropiada, asociada con dolor o sufrimiento posquirúrgicos o alteración posquirúrgica de la condición general. Los ejemplos incluyen: toracotomía, craneotomía, laparotomía, orquidectomía, linfodectomía, tiroidectomía, cirugía ortopédica con estabilización efectiva y cuidado de heridas, trasplante de órganos con tratamiento efectivo del rechazo, implantación quirúrgica de catéteres, o dispositivos biomédicos (por ejemplo, transmisores de telemetría, minibombas, etc.);
- d) Modelos de inducción de tumores, o tumores espontáneos, que se prevé que causen dolor o angustia moderados o interferencia moderada con el comportamiento normal;

- e) Irradiación o quimioterapia con una dosis subletal, o con una dosis que de otro modo sería letal, pero con reconstitución del sistema inmunitario.
Cabría esperar que los efectos nocivos fueran leves o moderados y que fueran efímeros (< 5 días);
- f) Cría de animales genéticamente modificados que se espera den lugar a un fenotipo con efectos moderados;
- g) Producción de animales genéticamente modificados mediante procedimientos quirúrgicos;
- h) Uso de jaulas metabólicas que impliquen una restricción moderada de movimientos durante un período prolongado (hasta 5 días);
- i) Estudios con dietas modificadas que no cubren las necesidades nutricionales de todos los animales y que se espera que causen una anomalía clínica moderada en el período de estudio;
- j) Retirada de la alimentación durante 48 horas en ratas adultas;
- k) Provocar reacciones de escape y evitación en las que el animal no pueda escapar o evitar el estímulo, y que se espera que den lugar a una angustia moderada.

3. Severo:

- a) Ensayos de toxicidad en los que la muerte sea el punto final o se prevean muertes y se provoquen situaciones fisiopatológicas intensas. Por ejemplo, ensayo de toxicidad aguda con una única dosis (véanse las directrices de la OCDE sobre ensayos);

- b) Ensayos de dispositivos en los que el fracaso pueda causar dolor o angustia severos o la muerte del animal (por ejemplo, dispositivos de reanimación cardiaca);
- c) Ensayo de potencia de una vacuna caracterizada por la alteración persistente del estado del animal, enfermedad progresiva que causa la muerte, asociada con dolor, angustia o sufrimiento moderados duraderos;
- d) Irradiación o quimioterapia con una dosis letal sin reconstitución del sistema inmunitario, o reconstitución con la producción de enfermedad de injerto contra huésped;
- e) Modelos con inducción de tumores, o con tumores espontáneos, que se espera causen enfermedad mortal progresiva asociada con dolor, angustia o sufrimiento moderados duraderos. Por ejemplo, tumores que causan caquexia, tumores óseos invasivos, tumores que dan lugar a diseminación metastásica, y tumores que se permite que se ulceren;
- f) Intervenciones quirúrgicas y de otro tipo en animales bajo anestesia general que se espera den lugar a dolor, sufrimiento o angustia postoperatorios severos, o moderados pero persistentes, o a una alteración severa y persistente de la condición general del animal. Producción de fracturas inestables, toracotomía sin analgesia adecuada, o traumatismo para producir el fallo multiorgánico;
- g) Trasplante de órgano donde es probable que el rechazo del órgano origine angustia o la alteración severa del estado general del animal (por ejemplo, xenotrasplante);

- h) Reproducción de animales con trastornos genéticos que se espera experimenten una alteración severa y persistente de su estado general, por ejemplo la enfermedad de Huntington, distrofia muscular, modelos de neuritis crónicas recurrentes;
- i) Uso de jaulas metabólicas que impliquen una restricción severa de los movimientos durante un período prolongado;
- j) Choque eléctrico ineludible (por ejemplo para producir invalidez inducida);

- k) Aislamiento completo durante períodos prolongados de especies gregarias, por ejemplo perros y primates no humanos;
- l) Inmovilización de ratas para inducirles úlceras gástricas o fallo cardiaco por estrés;
- m) Natación forzada o pruebas de ejercicio con el agotamiento como punto final.

5. Guía para el cuidado y manejo de animales de laboratorio

Committee for the Update of the Guide for the Care and Use of Laboratory
Animals

Institute for Laboratory Animal Research

Division on Earth and Life Studies

National Research Council, USA

*(Guide for the Care and Use of Laboratory Animals, 8th Ed. 2010, NRC, USA,
(Pag. 25-26))*

Protocol Review

The animal use protocol is a detailed description of the proposed use of laboratory animals. The following topics should be considered in the preparation of the protocol by the researcher and its review by the IACUC:

- Rationale and purpose of the proposed use of animals
- A clear and concise sequential description of the procedures involving the use of animals that is easily understood by all members of the committee
- Availability or appropriateness of the use of less invasive procedures, other species, isolated organ preparation, cell or tissue culture, or computer simulation (see Appendix A, Alternatives)

- Justification of the species and number of animals proposed; whenever possible, the number of animals and experimental group sizes should be statistically justified (e.g., provision of a power analysis; see Appendix A, Experimental Design and Statistics)
- unnecessary duplication of experiments
- nonstandard housing and husbandry requirements
- impact of the proposed procedures on the animals' well-being
- appropriate sedation, analgesia, and anesthesia (indices of pain or invasiveness might aid in the preparation and review of protocols; see Appendix A, Anesthesia, Pain, and Surgery)
- conduct of surgical procedures, including multiple operative procedures
- postprocedural care and observation (e.g., inclusion of post-treatment or postsurgical animal assessment forms)
- description and rationale for anticipated or selected endpoints
- criteria and process for timely intervention, removal of animals from a study, or euthanasia if painful or stressful outcomes are anticipated
- method of euthanasia or disposition of animals, including planning for care of long-lived species after study completion
- adequacy of training and experience of personnel in the procedures used, and roles and responsibilities of the personnel involved
- use of hazardous materials and provision of a safe working environment.

While the responsibility for scientific merit review normally lies outside the IACUC, the committee members should evaluate scientific elements of the protocol as they relate to the welfare and use of the animals. For example, hypothesis testing, sample size, group numbers, and adequacy of controls can relate directly to the prevention of unnecessary animal use or duplication of experiments. For some IACUC questions, input from outside experts may be advisable or necessary. In the absence of evidence of a formal scientific merit review, the IACUC may consider conducting or requesting such a review (Mann and Prentice 2004). IACUC members named in protocols or who have other conflicts must recuse themselves from decisions concerning these protocols.

At times, protocols include procedures that have not been previously encountered or that have the potential to cause pain or distress that cannot be reliably predicted or controlled. Relevant objective information about the procedures and the purpose of the study should be sought from the literature, veterinarians, investigators, and others knowledgeable about the effects on animals. If little is known about a specific procedure, limited pilot studies, designed to assess both the procedure's effects on the animals and the skills of the research team and conducted under IACUC oversight, are appropriate. General guidelines for protocol or method evaluation for some of these situations are provided below, but they may not apply in all instances.