

INVESTIGACIÓN BÁSICA

# REPARACIÓN DE LESIONES DEL NERVIIO FACIAL MEDIANTE ALOINJERTOS CRIOPRESERVADOS EN RATAS INMUNODEPRIMIDAS CON CICLOSPORINA A

M. ACUÑA GARCÍA\*\*\*, L. M. GIL CARCEDO GARCÍA\*, N. ÁLVAREZ ISCAR, L. M. REDONDO\*\*, A. SERRAT SOTO\*\*, L. A. RODRÍGUEZ TOVES\*\*, C. VAQUERO PUERTA\*\*

\*CÁTEDRA DE ORL. \*\*LABORATORIO DE CIRUGÍA EXPERIMENTAL. \*\*\*HOSPITAL RÍO CARRIÓN. PALENCIA Y CÁTEDRA DE ORL DE VALLADOLID. FACULTAD DE MEDICINA. UNIVERSIDAD DE VALLADOLID.

## RESUMEN

**E**l objetivo de este trabajo es comprobar el papel de la inmunodepresión con ciclosporina A en la reparación de un defecto nervioso en el tronco del nervio facial de la rata con aloinjertos criopreservados.

El defecto nervioso, en el tronco extratemporal del nervio facial de la rata Wistar tenía 4 mm de longitud.

Diseñamos 3 grupos:

- Control normal.
- Reparación con aloinjertos criopreservados.
- Reparación con aloinjertos criopreservados e inmunodepresión con ciclosporina A.

Métodos de evaluación de la regeneración tras 4 meses:

- Grado clínico de función.
- Latencia de conducción.
- Contaje de axones.
- Area media de las fibras nerviosas en el tronco nervioso distal al injerto.

El grado de función facial en los 2 grupos reparados era muy similar al normal en cuanto a motilidad facial pero los resultados electrofisiológicos y morfo-métricos diferían de manera significativa respecto al nervio normal.

Las conclusiones a las que llegamos fueron las siguientes:

1.º La utilización de aloinjertos criopreservados en animales inmunodeprimidos o no, logra la adquisición de una función facial clínicamente valorada como buena o muy buena.

2.º La criopreservación de injertos nerviosos alógenos resulta un proceso de almacenamiento de tejidos útil para reparar lesiones nerviosas. Los injertos así conservados llegan a alcanzar resultados clínicamente satisfactorios en el modelo que hemos utilizado.

3.º La inmunosupresión de ratas portadoras de aloinjertos con ciclosporina A acarrea la aparición de una función facial que mejora poco la lograda con los otros injertos en este modelo experimental. Los parámetros histológicos y morfométricos se asemejan en mayor medida a los nervios normales.

**PALABRAS CLAVE:** Injertos nerviosos. Inmunosupresión. Rata Wistar. Defectos nerviosos pequeños.

## ABSTRACT

### REPARATION OF FACIAL NERVE GAPS WITH CRYOPRESERVED ALLOGRAFTS IN RATS IMMUNOSUPPRESSED WITH CICLOSPORIN A

**T**he aim of this study is to assess the feasibility of peripheral nerve allografts pretreated utilizing cold storage and cyclosporin A to improve the facial nerve regeneration in Wistar rat.

Three groups were designed:

- Normal Wistar rats.
- 4 millimeters nerve gaps repaired with cryopreserved nerve allografts.
- 4 millimeters nerve gaps repaired with cryopreserved nerve grafts and treated with cyclosporin A.

At 16 weeks post-ensraftment the animals were evaluated:

- Facial palsy grading system.
- Electrophysiologic latency.
- Axonal counting.

— Nervous fiber area immediately distal to the graft.

The facial function of the experimental groups was similar to the control rats while the latency and morphometric parameters was poor than the normal rats.

Conclusions:

1.º Cryopreserved nerve allografts in facial nerve repair in rats are useful in the acquisition of a facial functional nerve recovery as much in immunosuppressed animal as not.

2.º Cryopreservation of nerve allografts results a good method of storage of nerve grafts.

3.º Cyclosporin A immunosuppression improved not much the grading facial palsy in this model but the electrophysiologic and morphometry is significantly better.

**KEY WORDS:** Nerve grafts. Inmunosupresion. Wistar rat. Short gaps.

**Correspondencia:** Manuel Acuña García. Ferrocarril, 16, 2.º B. 47004 Valladolid.

**Fecha de recepción:** 6-5-2000

## INTRODUCCIÓN

Los defectos nerviosos de cierta longitud no permiten emplear la sutura termino-terminal por lo deletéreo de la tensión en la zona de coaptación<sup>1-4</sup>. En estos casos se utilizan injertos de nervios sensitivos autólogos. Estos se obtienen en general del mismo campo lesional o de campos lejanos y presentan diversos problemas, entre ellos provocar problemas de anestesia de la región donante o, sobre todo, ser una fuente limitada de material<sup>5</sup>.

Se investiga desde hace años la utilización de injertos nerviosos de procedencia alogénica. Estos podrían presentar una arquitectura similar a la del nervio dañado y facilitan la posibilidad de tener almacenados fragmentos nerviosos de distintos calibres y longitudes adaptables a cada caso particular.

Como obstáculo para su utilización se encuentra la aparición de rechazo y la posibilidad de transmisión de enfermedades.

El estudio de estos métodos experimentales de reparación nerviosa se han llevado a cabo en multitud de modelos animales. Los animales más utilizados son las ratas, y en éstas el nervio más empleado ha sido el ciático o algunas de sus ramas.

El nervio facial ha sido estudiado en distintos modelos. El tronco del nervio facial de la rata, como modelo de nervio craneal, se ha utilizado para comparar distintos tipos de sutura<sup>6,7</sup>, en estudios somatotópicos con HRP (peroxidasa retrógrada de rábano) y en regeneración tras ligadura de ramas. Nos parece interesante comprobar si en la reparación de un defecto nervioso de escasa longitud en el tronco del nervio facial de la rata con aloinjertos criopreservados existe diferencia entre inmunodeprimir o no a los animales con ciclosporina A (Cy A).

## MATERIAL Y MÉTODOS

Los animales empleados fueron ratas Wistar con la misma edad y de sexo macho, de peso entre 250 y 275 gramos al inicio del trabajo. Los animales donantes de aloinjertos eran procedentes de camadas no emparentadas.

Se cuenta con 3 grupos experimentales:

— Grupo 0-normal: 4 animales controles cuyos troncos del nervio facial nos sirvieron como referencias de normalidad.

— Grupo 1-aloinjertos: éste consta de 6 ratas a las que se les seccionó un fragmento de unos 3 mm de su tronco del nervio facial izquierdo y en el defecto se interpuso un aloinjerto criopreservado de nervio facial de 4 mm. El lado derecho, indemne, se dejó como control clínico.

— Grupo 2-aloinjerto-Cy A: compuesto de 7 ratas a las que se les seccionó un fragmento del tronco del ner-

vio facial del lado izquierdo de 3 mm de longitud y se colocó un aloinjerto criopreservado de 4 mm de longitud. Los animales fueron tratados con Cy A según protocolo que se describe posteriormente.

### Proceso de criopreservación

La sustancia crioprotectora era una dilución de dimeilsulfóxido (DMSO) y formamida a concentraciones molares 2:1 en el solvente PBS hemiconcentrado. Se prepararon tres recipientes con concentraciones de protector progresivamente mayores, diluidos al 5, 10 y 20%.

El injerto nervioso se suturaba en sus extremos sobre una plancha de material sintético para evitar pliegues durante la criopreservación.

Se pasaba por los 3 recipientes, en dosis crecientes y por 15 minutos cada uno para evitar procesos de deshidratación.

Tras ello se sumerge en la sustancia crioprotectora inicial y se mantiene en nitrógeno líquido hasta su anastomosis.

### Técnica anestésica

Como anestésico se utilizó clorhidrato de ketamina (Ketolar<sup>®</sup>) a dosis de 60 mg por kilogramo en la primera dosis por vía intraperitoneal, manteniéndola según necesidades con dosis fraccionadas.

### Establación

Se mantuvieron en jaulas de plástico, una por grupo, en condiciones estándar de habitabilidad. La alimentación era *ab libitum* y la temperatura de 20 grados centígrados.

### Técnica quirúrgica

La anatomía quirúrgica y la técnica quirúrgica de abordaje están descritas en trabajos previos<sup>8,9</sup>. Se anastomosaba con 2 puntos epineurales separados 180 grados.

### Protocolo de inmunosupresión

A las ratas del grupo 2 se les administra diariamente una dosis de 15 mg/kg/día de ciclosporina A en solución oleosa mediante inyección subcutánea.

### Parámetros de evaluación de la regeneración

Los parámetros evaluados a los 4 meses fueron:

- clínicos.
- electrofisiológicos.
- contaje de axones (microscopía óptica).
- morfometría (microscopía electrónica).

#### Respecto a la clínica

En cada animal se observó de manera subjetiva por parte de un mismo observador (M.A.) el grado de parálisis facial que presentaba.

— *Signos espontáneos*: parpadeo, simetría de comisuras labiales.

— *Signos provocados*: parpadeo tras irrigación sobre los ojos.

Se graduaba de 1 a 5 cruces, siendo mayor su número cuanto más se acercaban los resultados a la normalidad.

#### Respecto a la electrofisiología

Se cuantifican las latencias de conducción del estímulo en el momento inmediatamente anterior al sacrificio del animal. Se aplica proximal al injerto mediante un electrodo coaxial y se registraba el tiempo que tardaba en aparecer el potencial muscular evocado en el músculo orbicular de los labios.

Estos estudios nerviosos de conducción se realizan con el animal bajo anestesia por ketamina a 60 mg por kilogramo.

Se realizó una estimulación de 0,1 milisegundo con una onda de corriente continua de intensidad doble del umbral.

#### Respecto al contaje de axones

Se extrae un fragmento del nervio facial inmediatamente distal al injerto. Se realizan cortes semifinos de 1 micra tras teñir con el azul de Richardson para poner en evidencia la mielina.

Se calcula el número de axones mielinizados en la sección nerviosa de cada espécimen (x400).

Desde el mismo momento que exponemos el nervio lo humedecemos con una mezcla de glutaraldehído y un buffer.

Tras resecar el injerto y la zona inmediatamente distal lo preparamos para microscopía óptica mediante:

1. Fijación con glutaraldehído al 2,5%.
2. Lavado durante una hora (cada 15 minutos renovación) con tampón de cacodilato al 0,1 M con 1 hora como mínimo y máximo de 1 semana.

3. Postfijación con tetróxido de osmio 2% de 30 minutos.
4. Lavado durante 1 hora con tampón cacodilato 0,1 M.
5. Deshidratación con series ascendentes de acetona.
6. Infiltración en spurr.
7. Encapsulación-inclusión en resina.
8. Polimerización.

Cortes semifinos de 1 micra.

Tinción con azul de Richardson:

Solución A:

Azul de metileno: 2,5 gr.

Tetraborato sódico: 10 gr.

Agua destilada: 200 cc.

Solución B:

Ácido periódico: 1,25 gr.

Azur II: 1,25 gr.

Agua destilada: 250 cc.

Se mezcla a pH 11 y se filtra.

Se realiza el contaje de axones en cada sección mediante el programa NIH 16 b image.

#### Respecto a la morfometría

Tras el proceso descrito anteriormente se realizan cortes ultrafinos con un ultratomo.

Mediante microscopía electrónica de transmisión y tras tinción con acetato de uranilo-citrato de plomo se realizan microfotografías a 5.250 aumentos de las secciones transversales de los nervios en la zona inmediatamente distal al injerto y en los nervios normales.

Estudiamos el área media de las fibras nerviosas como reflejo de la riqueza de la regeneración de tejido nervioso mediante el programa NIH 16 b image.

Los resultados obtenidos al medir los distintos parámetros del trabajo se presentaron según la estadística descriptiva en:

— Medidas de centralización: media.

— Medidas de dispersión: desviación estándar.

Para las comparaciones entre los distintos grupos problema y de éstos con el control utilizamos el test de la U de Mann Whitney (para muestras independientes).

En los contrastes de hipótesis el nivel de significación estadística elegido fue el 5% (error alfa = 5%).

## RESULTADOS

### A) Evaluación clínica

Las ratas del grupo 0, animales normales, recibieron como referencia control la máxima puntuación, 5 cruces.

Los grupos de ratas con aloinjertos criopreservados

(grupo 1) no mostraban diferencias globales entre ellas en ninguno de los apartados. En general había una leve asimetría bucal y la movilidad palpebral provocada por irrigación era perceptiblemente más perezosa que la normal.

El grupo de animales inmunodeprimidos, portadores de injertos alogénicos (grupo 2), presentaba el mayor grado de recuperación de función motora facial, con parpadeo enérgico indistinguible del normal en la mayor parte de los casos. La boca presentaba una simetría facial casi perfecta.

### B) Examen electrofisiológico

Todos los animales presentaban actividad motora espontánea de reinervación.

En el grupo control la latencia media fue de 1,213 mseg  $\pm$  0,193.

Los grupos 1 (2,133  $\pm$  0,166 mseg) y 2 (1,767  $\pm$  0,232) mostraban diferencias estadísticamente significativas entre ellos ( $p < 0,05$ ) y de ambos con el grupo control ( $p < 0,05$ ).

### Contaje de axones

Los animales no inmunodeprimidos (1) presentan el menor número de axones, con una peor distribución e imágenes de degeneración walleriana y de macrófagos.

En el grupo 2 se observa una gran densidad axonal, con las fibras mielínicas en regeneración creciendo en forma de racimos, con zonas conectivas compartimentándolos.

Los animales a los que se recuenta un mayor número de fibras son los inmunodeprimidos con diferencia significativa con los no tratados con Cy A ( $p < 0,05$ ).

Los dos grupos experimentales tenían mayor número de axones que el grupo control o normal ( $p < 0,05$ ) (tabla 1) (figura 1).

**Tabla 1: Número medio de fibras nerviosas mielinizadas en cada grupo experimental**

Grupo	0	1	2
Contaje de fibras	3828 $\pm$ 307	5526 $\pm$ 1206	6780 $\pm$ 881

### Análisis morfométrico

El grupo 0 presenta fibras nerviosas mielinizadas normales, con tamaños similares y tamaño regular. No existen tractos perineurales y hay escasas fibras amielínicas.

Los animales del grupo 1 presentan numerosas fibras mielinizadas con tamaños muy dispares, desde intermedios hasta muy pequeños en relación con las normales ( $p < 0,01$ ).

Los animales del grupo 2 presentaban dimensiones muy inferiores al nervio normal ( $p < 0,01$ ) y superiores (casi el doble) que las fibras de los animales no inmunodeprimidos ( $p < 0,05$ ) (tabla 2) (figura 2).

**Tabla 2: Área media de las fibras nerviosas de cada grupo experimental**

Grupo	0	1	2
Área $\mu X_v$	52,4 $\pm$ 5,9	10,96 $\pm$ 3,3	19,6 $\pm$ 4,9

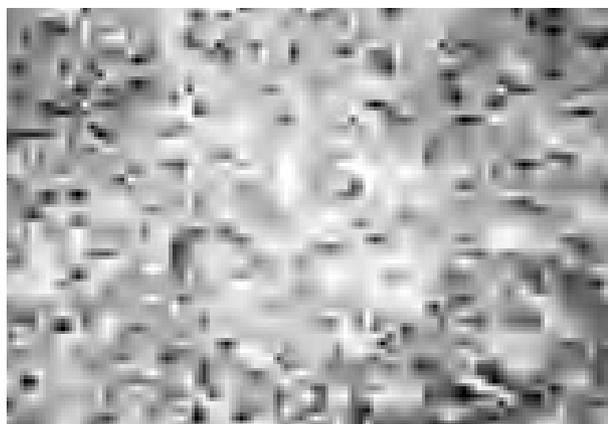


Foto 1: grupo 1



Foto 2: grupo 2

**Figura 1. Microscopía óptica (x 400): riqueza en fibras mielinizadas (contaje) de los distintos grupos.**



Foto 3: grupo 1



Foto 4: grupo 2

Figura 2. Microscopía electrónica (x 5250): morfometría (área) de las distintas fibras axonales de los distintos grupos.

## DISCUSIÓN

En este modelo experimental la utilización de aloinjertos criopreservados consigue la recuperación clínica. La inmunodepresión no altera los resultados clínicos obtenidos pero sí los morfométricos.

Los análisis histológicos y morfométricos mostraban diferencias notables con lo hallado en nervios normales.

Se observó que las células de Schwann permanecen en el injerto para ser utilizadas como vainas o conductos de regeneración por los axones en crecimiento desde el cabo proximal de un autoinjerto<sup>10</sup>. Asimismo, si la inmunosupresión era continua en aloinjertos<sup>11</sup> e incluso en xenoinjertos<sup>12</sup> las células de Schwann llevaban a cabo la misma función que en los autoinjertos.

En nuestro modelo la adicción de inmunosupresión mejora el área media de las fibras nerviosas pero no se acompaña de diferencias significativas en la recuperación clínica de la función facial.

La mejoría de los parámetros estructurales con el tratamiento es citado por la mayor parte de los autores, que encuentran una correlación con los parámetros de resultados funcionales y clínicos que estudian.

La capacidad de la Cy A para mitigar la respuesta histológica e inmunológica del huésped contra los aloinjertos nerviosos ha sido demostrada por muchos investigadores.

La primera evidencia, en ratas con disparidades histocompatibles mayores, fue publicada por Zalewski en 1980<sup>13</sup>. Encontró supervivencia de nervios periféricos tras dosis subcutáneas de Cy A a 25 mg/kg/día.

Estudios posteriores con otras dosis y otras vías de administración evidenciaron la ausencia de infiltrado celular en el fragmento alogénico, incluso en ratas sensibilizadas previamente con nervios o piel del donante<sup>14,15</sup> y la regeneración nerviosa a su través.

Se observó que la Cy A (i.v.) contribuía al mantenimiento de la microvascularización y al retraso y disminución del infiltrado celular inflamatorio<sup>16,17</sup>.

La relación dosis-respuesta efectiva y la mínima dosis necesaria fue establecida por Bain (1988) en 5 mg/kg/día subcutáneo<sup>18</sup>.

En nervio ciático de rata se halló que la congelación-descongelación de los injertos y el almacenamiento prolongado lograba mejores resultados que los aloinjertos pero peor que los autoinjertos midiendo la función mediante el índice de función del ciático de De Medinaceli<sup>19,20</sup>. La mejoría morfométrica y electrofisiológica en animales inmunodeprimidos coincide con otros autores<sup>21</sup>. En este trabajo la regeneración a través de aloinjertos en ratas inmunodeprimidas con Cy A era similar al logrado a través de injertos singénicos y significativamente superior al que se observaba en aloinjertos en animales no tratados.

Mediante datos morfométricos también se logró documentar el papel favorecedor de este tratamiento en un modelo murino<sup>22</sup>.

En primates tratados con Cy A se observó regeneración indistinguible a través de autoinjertos en relación con aloinjertos mediante parámetros clínicos, histológicos y electrofisiológicos<sup>14,23,24</sup>.

El único estudio que no describe una regeneración satisfactoria con estos protocolos se puede deber a que realiza sus comparaciones respecto a nervios normales y no a autoinjertos.

En nuestro diseño creímos interesante combinar 2 factores, la criopreservación previa de los nervios y el papel que el tratamiento con ciclosporina tenía sobre su función. La valoración en este último supuesto no fue distinta en cuanto a las características subjetivas evaluadas, pero sí varió cuando valoramos los parámetros objetivos de normalidad. Creemos interesante esta distin-

ción, pues como hemos visto previamente una discordancia entre distintos parámetros morfométricos se corresponde con una situación clínica muy parecida a la normal.

La similitud de la recuperación funcional en nervios con distinto número de axones lo han puesto en evidencia otros autores. La reducción de un tercio o más en el número de axones no tiene un reflejo negativo en la capacidad de recuperación clínica o en la reaparición de respuestas eléctricas normales<sup>25</sup>. Un nervio puede recuperar una función indistinguible de la normal con sólo la mitad de sus axones, lo que soportaría que la función facial en los dos grupos estudiados por nosotros fuese similar pese a la disparidad en el conteo de axones.

Gulati (1988)<sup>26</sup> observa que los axones huéspedes pueden crecer a lo largo de 4 cm en injertos celulares pero no logran avanzar más de 2 cm en los injertos acelulares. Concluye que la lámina basal de los injertos no es capaz de servir de soporte para la regeneración axonal cuando la distancia a salvar es larga. La causa parece ser la incapacidad de las células de Schwann de mirar cuando esa longitud es de varios centímetros.

En este modelo, dado que la longitud del defecto nervioso es de pocos milímetros se puede entender que

los resultados clínicos fuesen similares utilizásemos o no inmunodepresión.

De hecho la reconstrucción de defectos de 1 cm de longitud en el nervio ciático con conductos sintéticos (PLLA) daba una densidad de axones distales similares al isoinjerto<sup>27</sup>.

## CONCLUSIONES

1.º La utilización de aloinjertos criopreservados en animales inmunodeprimidos o no, resulta en la adquisición de una función facial clínicamente valorada como buena o muy buena.

2.º La criopreservación de injertos nerviosos alogénos resulta un proceso de almacenamiento de tejidos útil para reparar lesiones nerviosas. Los injertos así conservados llegan a alcanzar resultados clínicamente satisfactorios en el modelo que hemos utilizado.

3.º La inmunosupresión de ratas portadores de aloinjertos con ciclosporina A acarrea la aparición de una función facial que mejora poco la lograda con los otros injertos. Los parámetros histológicos y morfométricos se asemejan en mayor medida a los nervios normales.

## REFERENCIAS

- 1.- Millesi H. Human nerve grafting. *Clin Plast Surg* 1984; 11: 195-113.
- 2.- Brunelli G. Nerve suture. *International Surgery* 1980; 65: 499-501.
- 3.- Hentz V, Rosen J, Xiao S, MacGill K. The nerve gap dilemma: a comparison of nerve repaired end to end under tension with nerve grafts in a primate model. *J Hand Surg (Am)* 1993; 18: 417-425.
- 4.- Miyamoto Y. Experimental study of the results of nerve suture under tension versus nerve grafting. *Plast Reconstr Surg* 1979; 64: 540-546.
- 5.- Spector JG, Lee P. Facial nerve regeneration through autologous nerve grafts. *Laryngoscope* 1991; 101: 537-554.
- 6.- Murray JA, Williams M, Mountain RE. A comparison of absorbable and non absorbable 10-0 sutures for the repair of a divided rat facial nerve. *Clin Otolaryngol* 1994; 19: 61-62.
- 7.- Medders G, Mattox DE. Effects of fibrin glue on rat facial nerve regeneration. *Otolaryngol Head Neck Surg* 1989; 100: 106-109.
- 8.- Mattox DE, Felix H. Surgical anatomy of the rat facial nerve. *Am J Otolaryngol* 1987; 8: 43-47.
- 9.- Acuña García M, Gil Carcedo García LM, Álvarez Iscar N., Toledano M, Redondo LM, Vaquero C. Abordaje microquirúrgico y anastomosis de injertos en el tronco del nervio facial de la rata Wistar. *Acta Otorrinolaringol Esp* 1998; 49: 513-517.
- 10.- Aguayo AJ, Eps J, Charron LC, Bray GN. Multipotentiality of schwann cells in cross anastomosed and grafted myelinated and unmyelinated nerves. *Brain Res* 1976; 104: 1-20.
- 11.- Takata H, Ishida O, Ochi M, Ikuta Y. Rejection and regeneration in peripheral nerve homografts in rats after withdrawal of cyclosporin: morphological and immunohistochemical assessment. *Scand J Plast Reconstr Surg Hand Surg* 1999; 33: 373-377.
- 12.- Aguayo AJ, Kasarjian J, Skamene E, Kongshavn P, Bray GM. Myelination of mouse axons by schwann cells transplanted from normal and abnormal human nerves. *Nature* 1977; 268: 753-758.
- 13.- Zalewski AA, Silvers WK. An evaluation of nerve repair with nerve allografts in normal and immunologically tolerant rats. *J Neurosurg* 1980; 52: 557-563.
- 14.- Zalewski AA, Gulati AK. Evaluation of histocompatibility as a factor in the repair of nerve with a frozen allograft. *J Neurosurg* 1982; 56: 550-554.
- 15.- Zalewski AA, Fahy Gm, Azzam NA, Azzam RN. The fate of cryopreserved nerve isografts and allografts in normal and immunosuppressed rats. *J Comp Neurol* 1993; 331: 134-147.
- 16.- Grochowicz P, Hettlage R, Schatzl M. Immunosupresion in nerve allografting: analysis of revascularization and cellular infiltrates. *Transpl Proc* 1985; 17: 675-677.
- 17.- Hammer C, Hettlage R, Grochowicz P, Schatzl M. Cellular rejection mechanisms in allogeneic nerve grafts under cyclosporin treatment. *Transpl Proc* 1985; 27: 1438-1439.
- 18.- Bain JR, Mackinnon SE, Hudson AR, Falk RE, Hunter DA. The peripheral nerve allograft: a dose response curve in the rat immunosup-

pressed with cyclosporin A. *Plast Reconstr Surg* 1988; 82: 447-455.

**19.-** Evans PJ, Mackinnon SE, Mida R, Wade JA, Hunter DA, Nakao Y. Regeneration across cold preserved peripheral nerve allografts. *Microsurgery* 1999; 19: 115-127.

**20.-** Evans PJ, Mackinnon SE, Mida R, Wade JA, Hunter DA, Nakao Y. Regeneration across cold preserved peripheral nerve allografts. *Microsurgery* 1999; 19: 115-127.

**21.-** Bain JR, Mackinnon SE, Hudson AR, Falk RE, Hunter DA. The

peripheral nerve allograft: an assessment of regeneration across nerve allografts in rats immunosuppressed with cyclosporin A. *Plast Reconstr Surg* 1988; 82: 1052-1064.

**22.-** Ishida O, Ochi M, Miyamoto Y, Kuta Y, Ahiyama M. Suppression by cyclosporine of cellular and humoral reactivity after peripheral nerve allografts in mice. *Transplantation* 1989; 48: 824-829.

**23.-** Bain JR, Mackinnon SE, Hudson AR, Wade J, Evans P, Makino A. The peripheral nerve allograft in

the primate immunosuppressed with cyclosporin A: I. Histologic and electrophysiologic assessment. *Plast Reconstr Surg* 1992; 90: 1036-1046.

**24.-** Fish S, Bain JR, Mckee N, Shettler AG. The peripheral nerve allograft in the primate immunosuppressed with cyclosporin A. II: functional evaluation of reinnervated muscle. *Plast Reconstr Surg* 1992; 90: 1047-1052.

**25.-** Bernardo Cortes MJ, Suárez Nieto C, Ablanedo P. Motor and sensory facial nerve grafts: an experi-

mental comparative study. *Arch otolaryngol* 1984; 110: 378-383.

**26.-** Mackinnon SE, Midha R, Bain J, Hunter D, Wade J. An assessment of regeneration across peripheral nerve allografts in rats receiving short courses of cyclosporin A immunosuppression. *Neuroscience* 1992; 46: 585-593.

**27.-** Evans GR, Brandt K, Widmer MS, et al. In vivo evaluation of poly (L-lactic acid) porous conduits for peripheral nerve regeneration. *Biomaterials* 1999; 20: 1109-1115.