

**NEURORRAFIA DOBLE LATERO- LATERAL CON Y SIN
INJERTO NERVIOSO. MODELO EXPERIMENTAL EN RATAS**

Rodrigo Penagos López

Óscar GómezAya

Adriana Flórez Vargas

UNIVERSIDAD EL BOSQUE

POSTGRADO EN CIRUGÍA DE MANO

BOGOTA 2014

**NEURORRAFIA DOBLE LATERO- LATERAL CON Y SIN
INJERTO NERVIOSO. MODELO EXPERIMENTAL EN RATAS**

Universidad El Bosque

Fundación Santa Fe de Bogotá

Investigación de postgrado

Investigadores principales:

Dr. Rodrigo Penagos López

Dr. Óscar Gómez Aya

Dra. Adriana Alejandra Flórez Vargas

Asesores temáticos

Dr. Edgar Pinilla Pabón

Dr. Julio Bermúdez Panche

Asesor Metodológico

Dra. Lina María Prieto Garzón

Página de Aprobación

“La Universidad El Bosque, no se hace responsable de los conceptos emitidos por los investigadores en su trabajo, solo velará por el rigor científico, metodológico y ético del mismo en aras de la búsqueda de la verdad y la justicia”.

Tabla de Contenido

Introducción	11
Marco Teórico	12
Problema	16
Justificación.....	17
Objetivo General	18
Objetivos Específicos.....	18
PROPÓSITO	18
Aspectos Metodológicos	19
Tipo De Estudio	19
Población.....	19
Muestra.....	19
VARIABLES:	20
Técnica de recolección de la información.....	23
MATERIALES Y MÉTODOS	23
Intervención quirúrgica	24
Procesamiento de las muestras	27
Plan de Análisis.....	29
Aspectos Éticos	30
Organigrama.....	31
Cronograma.....	32
PRESUPUESTO	33
RESULTADOS.....	37
DISCUSIÓN	42
CONCLUSIONES	44
REFERENCIAS	45
Anexo 1 instrumento de recolección de datos.....	47

Lista de Tablas y Figuras

Tabla 1. Descripción de las variables.....	20
Tabla 2. Prueba t para dos muestras suponiendo varianzas iguales.....	37
Figura 1. Nervio ciático y su división en nervio Peroneo y Tibial.....	24
Figura 2. Magnificación Binocular.....	25
Figura 3. Modelo experimental de neurorrafia doble latero-lateral.....	26
Figura 4. Microscopia Óptica.....	28
Figura 5. Ultraestructura.....	29
Figura 6. Distribución porcentual de la degeneración axonal en los grupos A y B.....	38
Figura 7. Distribución porcentual de la Regeneración axonal en los grupos A y B.....	39
Figura 8. Distribución porcentual de las Fibras Amielínicas en los Grupo A y B.....	40

Introducción: La patología traumática del nervio periférico es una entidad frecuente y de difícil manejo. Su pronóstico está ligado a muchos factores como el tipo de lesión, tiempo de evolución, edad del paciente, condición de los tejidos blandos, tiempo de reparación y la presencia de un defecto que impida la neurorrafia. El propósito del estudio fue comprobar si la doble neurorrafia latero-lateral con y sin el uso de injerto de nervio autólogo, pueden contribuir con la formación de brotes axonales para la regeneración axonal en defectos nerviosos en un modelo experimental en ratas.

Objetivo: Comparar el patrón de regeneración axonal entre la neurorrafia doble latero-lateral con injerto de nervio y sin injerto de nervio en un estudio experimental en ratas observando bajo estudios de ultraestructura, el porcentaje de brotes axonales en la porción distal del nervio de cada una de estas técnicas.

Materiales y Métodos: Según modelo experimental de Viterbo, se realizó neurorrafia doble latero-lateral con y sin injerto, para estudio histopatológico de microscopía óptica y de ultraestructura en los segmentos proximal y distal a la lesión del nervio.

Resultados: Existe una diferencia estadísticamente significativa en la cantidad de brotes axonales de los nervios en el modelo experimental donde se utilizó la técnica de neurorrafia doble latero-lateral con injerto.

Conclusiones: Una alternativa de manejo de las lesiones de nervio periférico podría ser la neurorrafia doble latero lateral que al adicionarle un injerto de nervio aumenta el número de brotes axonales y disminuye la formación de tejido conectivo, mejorando así el pronóstico de dichas lesiones.

*Palabras Claves: Neurorrafia doble latero-lateral, injerto de nervio,
microcirugía,ratas*

Introduction: Traumatic peripheral nerve injury is a common and difficult to manage entity. The prognosis is related to many factors such as type of injury, time of evolution, patient age, condition of the soft tissues, repair time and the presence of a defect that prevents neurorrhaphy. The purpose of the study was to test whether the double side to side neurorrhaphy with and without the use of autologous nerve graft may contribute to axonal sprouting for axonal regeneration in nerve defects in an experimental rat model.

Objective: To compare the pattern of axonal regeneration between the double side to side neurorrhaphy with and without nerve graft in an experimental study in rats, observing under ultrastructure studies the percentage of axonal sprouting in the distal portion of the nerve of each of these techniques.

Materials and Methods: Based in an experimental model of Viterbo, double side to side neurorrhaphies with and without grafting were performed and studied under light microscopic histopathology and ultrastructure studies at the proximal and distal segments of the nerve lesion

Results: A statistically significant difference in the amount of axonal sprouting of the nerves was found in the experimental model where the double side to side neurorrhaphy with grafting technique was used.

Conclusions: An alternative management of peripheral nerve injuries could be double side to side neurorrhaphy with grafting given the fact that this technique increases the number of axonal sprouting and

reduces the formation of connective tissue, therefore improving the prognosis of these lesions.

Keywords: double side to side neurorrhaphy, nerve grafts, microsurgery, rats

Introducción

La patología traumática del nervio periférico es una entidad frecuente y de difícil manejo dada las variables condiciones a las que se pueden enfrentar y las múltiples alternativas de manejo(1,2). Su pronóstico está ligado a muchos factores como el tipo de lesión, su tiempo de evolución, la edad del paciente, la condición de los tejidos blandos circundantes al área de la lesión, la posibilidad o no de la reparación temprana y la presencia de un defecto de estructura nerviosa que impida o no la neurorrafia, entre otros(3,4).

En términos según Seddon, las lesiones de nervio periférico que se van a tratar son aquellas lesiones completas de nervio o neurotmesis, en los cuales existe un defecto no reparable mediante un método de sutura termino-terminal sin tensión(2,5).

El autoinjerto de nervio es el patrón de oro para el manejo de estas lesiones,(6) existiendo otras alternativas como los conductores nerviosos biológicos o sintéticos, la neurorrafia termino-lateral de un nervio lesionado a un nervio receptor y la neurorrafia latero-lateral, cada una de éstas con diferentes tipos de respuestas e indicaciones(7,8). De acuerdo a lo citado se quiso evidenciar con éste estudio si la neurorrafia doble latero-lateral con y sin el uso de injerto de nervio autólogo, pueden contribuir con la formación de brotes axonales para la regeneración axonal en defectos nerviosos en un modelo experimental en ratas, cuantificándose para ello el porcentaje de brotes axonales visibles en un corte histológico evaluado bajo microscopía electrónica o estudio de ultraestructura.

Marco Teórico

Las lesiones de nervio periférico son patologías traumáticas frecuentes en el ejercicio de la medicina, pueden llegar a ser un 61 % de los casos secundarias a lesiones penetrantes comparado con las lesiones no penetrantes y asociadas a accidentes de tránsito en un 22%(9). Debido a la mayor cantidad de accidentes de tránsito, existe un estudio en Europa referente a lesiones por accidentes de tránsito donde el número de lesiones nerviosas en la extremidad superior fue de 1.200, en el período de 1997 a 2005(10). Siempre han preocupado las lesiones del nervio periférico por el grado de discapacidad que estas lesiones pueden generar y el tiempo necesario para su recuperación, logrando una función aceptable en un 50% de los casos(11) . En las lesiones del plexo braquial desde principios del siglo pasado se han realizado grandes esfuerzos para reparar o tratar de disminuir las secuelas que dichas estructuras lesionadas pueden acarrear.(1,12)

El pronóstico de la lesión está ligado al tipo de fibra que se altere, es decir, sensitiva o motora, estas últimas con un tipo de recuperación más lenta; a la longitud de la lesión del nervio, al tiempo en el que se realice la reparación quirúrgica, a la edad del paciente, al mecanismo de lesión, y a las lesiones asociadas de tejidos blandos o lesiones vasculares(13,14).

Los nervios periféricos están compuestos por tejido conectivo y tejido nervioso. El tejido conectivo es el epineuro, perineuro y el endoneuro, que sirve de protección, aislamiento y organización de las fibras nerviosas. Es así como en un corte trasversal de un nervio periférico, el porcentaje de tejido conectivo en relación a tejido nervioso puede llegar a ocupar entre el 60 al 85% del espesor del nervio(12); dependiendo de la localización del

nervio, la cantidad de tejido conectivo varia, por ejemplo, cuando el nervio pasa por una articulación, la cantidad de tejido conectivo es mayor(3). Las fibras nerviosas son las mínimas unidades funcionales del nervio. Estas se dividen en fibras mielínicas donde cada una está rodeada por una vaina de mielina producida por una célula de Schwann, y las fibras amielínicas, donde varios grupos de fibras nerviosas están rodeadas por 1 sola célula de Schwann la cual no produce una vaina de mielina(15). El tejido conectivo que rodea al nervio en condiciones patológicas se puede engrosar como en las neuropatías por compresión (3). En el caso de las lesiones completas del nervio, la conducción nerviosa se puede ver alterada por aumento en el porcentaje de tejido conectivo como en la fibrosis o tejido cicatrizal que pueden bloquear o alterar la migración de los brotes axonales.(16)

Las lesiones neurológicas del nervio periférico fueron clasificadas por Seddon en tres categorías que son: neurapraxia, axonotmesis y neurotmesis con pronósticos de evolución diferentes(5). El manejo de la neurotmesis siempre requiere neurorrafia buscando realizar suturas sin tensión de los muñones de tipo termino-terminal cuando son posibles(11) pero cuando la sutura no se puede realizar sin tensión o hay defecto nervioso, el patrón de oro para el manejo es el autoinjerto de nervio(17). Se han desarrollado alternativas para el manejo de este tipo de lesiones que buscan en sí, recuperar la función motora o sensitiva lesionada. Dentro de la gama de alternativas están los conductores nerviosos biológicos o sintéticos, cuya limitante es la longitud del defecto a corregir(6,18) .Viterbo en 1992(19), reintroduce el manejo de este tipo de lesiones realizando un modelo experimental en ratas donde demuestra como la neurorrafia termino-lateral, en la cual, el muñón distal del nervio lesionado lo sutura a un nervio donante, logrando reinervar el músculo que había presentado la denervación experimental. Posterior a esto se desarrollan investigaciones

donde comparan el usar o no ventanas perineurales en neurorrafias termino-laterales (8, 20,21), donde se demuestran que los brotes axonales son mayores cuando se realiza las ventanas (22) y cuya explicación se da gracias a la presencia de factores de estimulación neurotrófica(23). Además se compara el uso de autoinjerto fresco contra autoinjerto predegenerado por una semana y lo que evidencia es mejores resultados en los brotes axonales donde se utilizó el injerto fresco(24).

Otras formas de manejar estas lesiones ante defectos de nervio periférico grandes son el uso de neurorrafias dobles término-lateral donde a un nervio receptor se le anastomosan los dos extremos de los muñones del nervio lesionado(7,17) o neurorrafias haciendo trasferencias de nervios sensitivos a nervios motores buscando preservar el trofismo muscular. En un estudio experimental en ratas se demostró que a los 4 meses a los músculos que se les había lesionado el nervio motor y se le había trasferido el nervio sensitivo, había perdido el trofismo muscular en un 80%(25). Otra alternativa con una mejor evidencia de aumento de brotes axonales son las neurorrafias latero-laterales. Existe un estudio experimental en ratas donde se compara la neurorrafia latero-lateral con la técnica clásica termino-lateral y los resultados evidencian un resultado funcional superior en la neurorrafia latero-lateral (26), de manera similar un estudio clínico de lesiones altas de plexo braquial evaluó el resultado funcional de las neurorrafias latero-laterales y los resultados fueron favorables ante una mayor recuperación motora y sensitiva, según la clasificación de la British Medical Research Council pudiendo alcanzar valores hasta M4 /S4. (13).

Al tratar de manejar las lesiones de nervio con defecto extenso, una conducta a seguir podría ser un injerto de nervio vascularizado, con la dificultad técnica que esto trae consigo.

La propuesta de la presente investigación fue determinar si la neurorrafia doble latero-lateral con injerto de nervio es superior, favoreciendo un aumento de brotes axonales comparándola con la neurorrafia doble latero-lateral en la que no se utilice injerto de nervio. Además, se tomó como grupo control la lesión del mismo nervio donde se realizó una anastomosis doble termino-terminal con autoinjerto sin tensión comparando el número de brotes axonales. La determinación de la presencia de brotes axonales y su cuantificación fue determinada por medio de estudios de microscopia óptica de alta resolución y ultraestructura. Se realizó un estudio experimental en ratas.

Problema

La patología traumática de nervioperiférico es una entidad común y a pesar de los 150 años de experiencia de la cirugía moderna son aún un problema por resolver(1).En un estudio Lykissas cita durante un período de 8 años un total de 791 casos de reconstrucciones de nervio axilar por lesiones de plexo braquial con técnica término lateral, un promedio de edad de 32 años y un tasa de éxito del 47,6 %(6). En Colombia Vergara refiere la asociación de lesiones de plexo braquial con accidentalidad en motos y la asociación de ésta última con el consumo de alcohol,(27) lo que concuerda con el 21 % de las lesiones de nervio periférico relacionadas por Saadat(9).Ante lesiones de nervio periférico con defectos segmentarios grandes donde la reparación termino-terminal sin tensión no es posible, se planteó en este modelo el uso de una neurorrafia doble latero-lateral con y sin injerto nervioso simulando en ratas ésta patología, fueron posteriormente valoradas midiendo si el uso de ésta técnica fue efectiva la reinervación del muñón distal y si el uso de injerto modificó positiva o negativamente los brotes axonales.

Justificación

En las lesiones de nervio periférico con grandes defectos existen varias alternativas de manejo, la utilización de injerto de nervio periférico con neurorrafia termino-terminal, la neurorrafia sencilla o doble termino-lateral, la neurorrafia latero-lateral con sutura del muñón distal al nervio donante, y el uso de conductores sintéticos o biológicos de nervios. Siendo varias las alternativas de manejo es entendible que su criterio de aplicación es individual para cada paciente todas en procura de una mejor respuesta al tratamiento dada la frecuencia de secuelas y discapacidades secundarias. Se planteó ahora una alternativa más, realizando una neurorrafia doble latero-lateral comparándola con el uso o no de autoinjerto de nervio como factor positivo de estimulación neurotrófica(23) en los muñones del nervio afectado. Se buscó demostrar si se favoreció la migración de brotes axonales en el segmento distal del nervio lesionado y cuantificar en qué proporción se presentó.

Objetivo General

Comparar el patrón de regeneración axonal entre la neurorrafia doble latero-lateral con injerto de nervio y sin injerto de nervio en un estudio experimental en ratas observando bajo estudios de ultraestructura y microscopia óptica el porcentaje de brotes axonales en la porción distal del nervio de cada una de estas técnicas.

Objetivos Específicos

1. Comprobar la presencia de brotes axonales en el muñón distal al defecto nervioso en la población tratada con neurorrafia doble latero – lateral de nervio más uso de autoinjerto de nervio.
2. Comprobar la presencia de brotes axonales en el muñón distal al defecto nervioso en la población tratada con neurorrafia doble latero – lateral de nervio sin uso de autoinjerto de nervio.
3. Comparar la presencia de brotes axonales en el muñón distal al defecto nervioso de los dos grupos anteriores con el grupo control de neurorrafia termino - terminal con injerto.

PROPÓSITO

Determinar si la técnica de neurorrafia doble latero-lateral con o sin injerto de nervio, podría ser una mejor alternativa en el manejo de lesiones de nervio periférico con defectos segmentarios grandes.

Aspectos Metodológicos

Tipo De Estudio

Estudio experimental.

Población

Ratas de la raza Wistar, de género masculino, con un peso promedio de 300g, observadas y cuidadas en bioterio de la Universidad El Bosque bajo condiciones normatizadas de alimentación, hidratación, humedad, temperatura, ventilación y ciclo día/noche.

Muestra

Se evaluaron un total de 12 ratas. Este tamaño de muestra fue calculado en el programa Epidat 3.1 bajo los siguientes supuestos: se espera una variación del porcentaje de efectividad máximo de un 20 %, con una confianza del 95 % y una precisión absoluta de 22 % para un total de 12 ratas y 36 muestras de nervios.

CRITERIOS DE INCLUSIÓN Y EXCLUSIÓN:

Los criterios de inclusión son iguales a los descritos para la población de estudio. No presentaron criterios de exclusión.

SESGOS:

No hay sesgos de selección por cuanto la población de estudio tiene similares características.

VARIABLES:

Tabla 1. Descripción de las variables

<i>Nombre</i>	<i>Definición conceptual</i>	<i>Definición operacional</i>	<i>Escala de medición</i>
Numero de brotes axonales del extremo proximal del nervio donante (5mm proximal a la fusión del extremo proximal del nervio lesionado)	Total de axones que se encuentran en un nervio sin lesión.	La totalidad de axones mielinizados en el nervio medida en milímetros cuadrados.	Cuantitativa discreta.
Numero de brotes axonales del extremo proximal del nervio receptor(5mm proximal a la fusión del extremo proximal del nervio receptor)	Total de axones que se encuentran en un nervio sin lesión.	La totalidad de axones mielinizados en el nervio medida en milímetros cuadrados	Cuantitativa discreta.
Numero de brotes axonales del extremo distal del nervio	Total de axones que se encuentran en un nervio después de la neurorrafia	La totalidad de axones mielinizados en el nervio medida	Cuantitativa discreta.

<p>donante (5mm distal a la fusión del extremo distal del nervio lesionado)</p>	<p>doble latero-lateral con y sin injerto autólogo de nervio.</p>	<p>en milímetros cuadrados.</p>	
<p>Numero de brotes axonales del extremo distal del nervio receptor (5mm distal a la fusión del extremo distal del nervio receptor)</p>	<p>Total de axones que se encuentran en un nervio después de la neurorrafia doble latero-lateral en el nervio receptor</p>	<p>La totalidad de axones mielinizados en el nervio medida en milímetros cuadrados.</p>	<p>Cuantitativa discreta.</p>
<p>Numero de fibras amielínicas del segmento proximal del nervio donante (5mm proximal a la fusión del extremo proximal del nervio lesionado)</p>	<p>Axones sin vaina de mielina donde un grupo de axones son envueltos por una sola célula de Schwann en el extremo proximal del nervio sin lesión</p>	<p>Total de fibras amielínicas medidas en milímetros cuadrados</p>	<p>Cuantitativa discreta.</p>
<p>Numero de fibras amielínicas del segmento proximal del</p>	<p>Axones sin vaina de mielina donde un grupo de axones son envueltos en</p>	<p>Total de fibras amielínicas medidas</p>	<p>Cuantitativa discreta.</p>

nervio receptor (5mm proximal a la fusión del nervio)	por una sola célula de Schwann en el extremo proximal del nervio sin lesión	milímetroscuadrados	
Numero de fibras amielínicas segmento distal del nervio donante. (5mm distal a la coaptación al donante) nervio lesionado)	Axones sin vaina de mielina donde un grupo de axones son envueltos por una sola célula de Schwann en el extremo distal a la neurorrafia doble latero-lateral	Total de fibras amielínicas medidas en milímetros cuadrados	Cuantitativa discreta.
Numero de fibras amielínicas segmento distal del nervio receptor. (5mm distal a la coaptación al donante) nervio lesionado)	Axones sin vaina de mielina donde un grupo de axones son envueltos por una sola célula de Schwann en el extremo distal a la neurorrafia doble latero-lateral	Total de fibras amielínicas medidas en milímetros cuadrados.	Cuantitativa discreta.

HIPÓTESIS

Existe un incremento de brotes axonales en el muñón distal del nervio periférico lesionado en el modelo experimental en ratas posterior a neurorrafia doble latero-lateral con injerto.

HIPÓTESIS ALTERNA:

No existe incremento en el número de brotes axonales en el muñón distal de nervio periférico lesionado en el modelo experimental en ratas posterior a neurorrafia doble latero-lateral con injerto.

Técnica de recolección de la información

El registro de los datos se realizó utilizando el formato de recolección de datos, el cual se le aplicó a cada uno de los animales de experimentación.

MATERIALES Y MÉTODOS

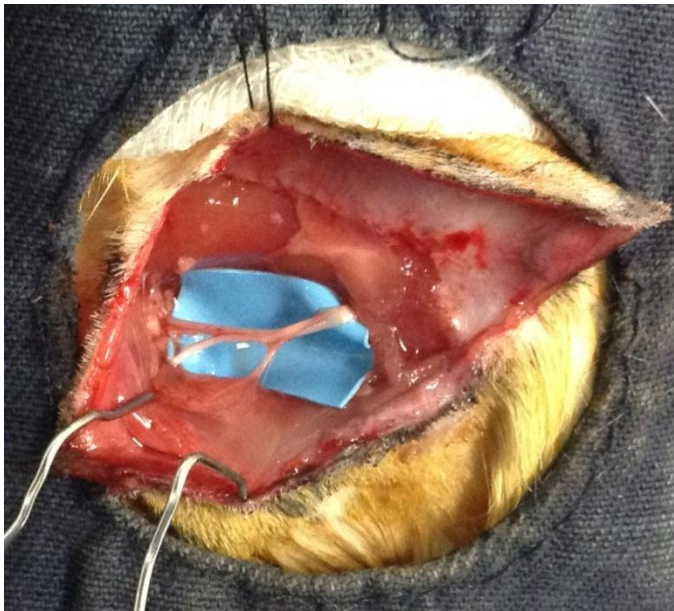
Se estudiaron 12 ratas de la raza Wistar que se observaron y cuidaron en el bioterio de la Universidad El Bosque, bajo condiciones normatizadas de alimentación, hidratación, humedad, temperatura, ventilación y ciclo día/noche. Se mantuvieron en jaulas individuales

de 30 x40, con ventilación en su pared superior, acceso ad libitum al agua y alimentación fue balanceada para suplir los requerimientos metabólicos de las ratas.

Intervención quirúrgica

Se utilizó el modelo de intervención quirúrgica experimental de lesión de nervio periférico descrito por Viterbo, donde se realizó una incisión vertical de 2cm de longitud en el glúteo y se diseco en profundidad hasta identificar el nervio ciático y sus dos ramas principales: el nervio peroneo y el nervio tibial. (Figura 1)

Figura 1. *Nervio ciático y su división en nervio Peroneo y Tibial.*



El lado de intervenido fue el izquierdo. La dosis de los anestésicos utilizados para inducir anestesia general fue: Ketamina de 40-90 mg / kg intraperitoneal, Xilacina de 5-15 mg/kg intraperitoneal mas anestesia local Xilocaína al 1 % 2 mg/kg intraincisional. Previo

rasurado del área glútea izquierda y asepsia con yodopovidona. Procedimiento quirúrgico con técnica microquirúrgica y utilizando magnificación binocular (Figura 2).

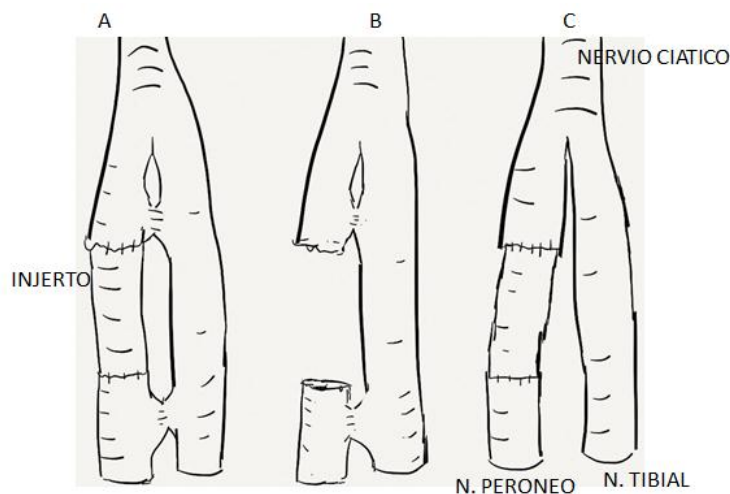
Figura 2. *Magnificación Binocular*



En el primer grupo se realizó una resección en el nervio peroneo a 2 mm del sitio de la bifurcación del nervio ciático, creando un defecto de nervio de 1.2 cm. Posterior a esto se realizó una neurorrafia doble latero-lateral de los muñones proximal y distal del nervio peroneo, mediante ventana epineural en el nervio lesionado y sutura de éste al nervio tibial intacto previa realización de ventana epineural (figura 3 A). Además en este grupo, se colocó un autoinjerto de nervio en los extremos del defecto realizando sutura termino-terminal en los muñones del nervio peroneo en el defecto generado. Las neurorrafias se realizaron con Nylon monofilamento 10/0 (figura 3A). En el segundo grupo, se realizó la resección en el nervio peroneo a 2 mm del sitio de la bifurcación del nervio ciático, creando un defecto de nervio de 1.2 cm, posterior a esto se realizó neurorrafia doble latero-lateral de los muñones

proximal y distal del nervio peroneo, realizándose una ventana epineural en el nervio lesionado y suturándolo al nervio tibial intacto previa realización de ventana epineural en el nervio receptor. Las neurorrafias se realizaron con Nylon monofilamento 10/0; en este grupo quedó el defecto de nervio de 1.2 cm, a el muñón proximal de este grupo, se le realizó una ligadura doble, para favorecer la formación de un neuroma intraneural y favorece la migración axonal por el sitio de la neurorrafia latero-lateral (figura 3B). Un tercer grupo, fue el control donde se realizó la técnica patrón de oro del manejo de los defectos nerviosos es decir el autoinjerto de nervio realizando una neurorrafia termino-terminal sin tensión e inmediatamente posterior a la realización de la sección completa del nervio (figura 3C).

Figura 3. *Modelo experimental de neurorrafia doble latero-lateral. A neurorrafia doble latero-lateral con injerto de nervio. B neurorrafia doble latero-lateral sin injerto de nervio. C grupo control con autoinjerto de nervio con neurorrafia termino-terminal*



A las 12 semanas posteriores a la intervención quirúrgica, se realizó bajo anestesia general la toma de la muestra de los nervios peroneos y de los nervios tibiales proximal y distalmente de los 3 grupos del estudio, a 3 mm del sitio de la neurorrafia. Se indujo eutanasia en las ratas de experimentación con sobredosis de pentobarbital intracardiaco

Procesamiento de las muestras

El transporte de la muestra se realizó en viales de plástico con glutaraldehído al 4% bajo estricta refrigeración a 4 grados centígrados. En el laboratorio de patología de la Fundación Santafé de Bogotá se realizó el proceso de fijación de las muestras en glutaraldehído al 4% por 24 horas; posterior a esto se lavó con amortiguador y agua destilada, postfijación con tetróxido de osmio al 1% durante 2 horas, a 4°C protegido de la luz y se realizó la fase de Contraste pre-imbibición con Acetato de uranilo al 3% durante 12 horas.

Seguido de un proceso de deshidratación en concentraciones ascendentes de etanol (al 50% por 10 minutos, al 70% por 10 minutos, al 90% por 10 minutos y al 100% por 10 minutos, dos veces). Luego infiltración con una mezcla de etanol absoluto: acetona en relación de 1:1.

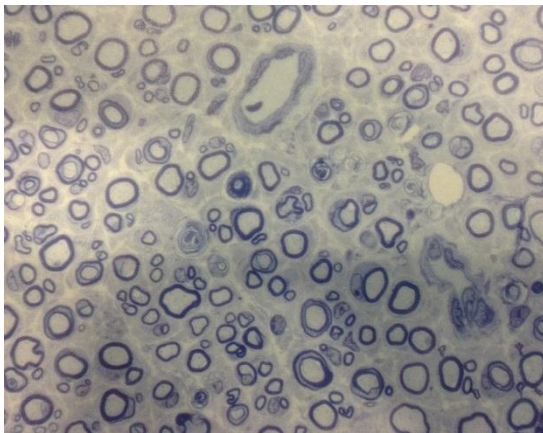
La imbibición se realizó con una mezcla 1:1 de acetón: resina durante 2 horas y finalmente en resina pura (Spurr) por 2 horas más. La inclusión fue realizada en moldes de plástico con las muestras debidamente rotuladas y se polimerizaron a 70° por un período de 24 horas.

Se hicieron cortes semifinos entre 250 a 350nm en un ultramicrotomo y se tiñeron con azul de toluidina al 1%. Las cortes se evaluaron con microscopio de óptico de alta resolución.

Durante el conteo de las variables se seleccionó el mejor campo, se hicieron las observaciones a 100 micras y se seleccionaron las áreas más representativas de cada nervio en mm².

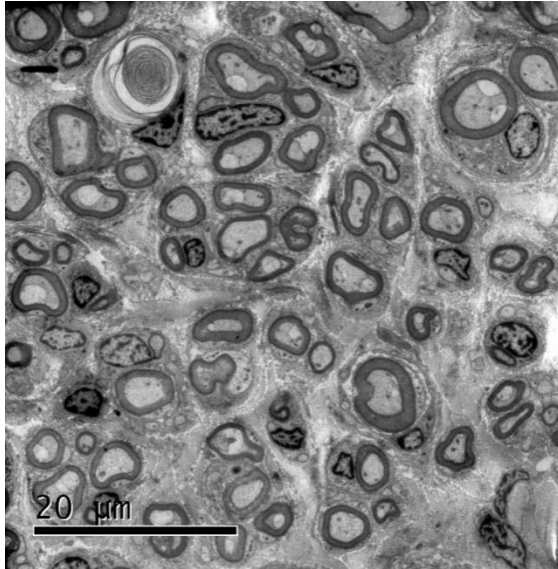
Posterior a la impresión de las fotografías y sobre éstas, se realizó el conteo del número de axones, patrón de degeneración axonal, patrón de regeneración axonal y presencia de fibras de aspecto amielínico (figura 4).

Figura 4. *Microscopia Óptica de Nervios estudiados.*



Se realizó observación de ultraestructura utilizando técnica de microscopía electrónica.

Figura 5. *Microscopia Electrónica de Transmisión, los cortes muestran grupos de regeneración axonal caracterizados por varios brotes axonales, con vainas de mielina delgadas.*



Plan de Análisis

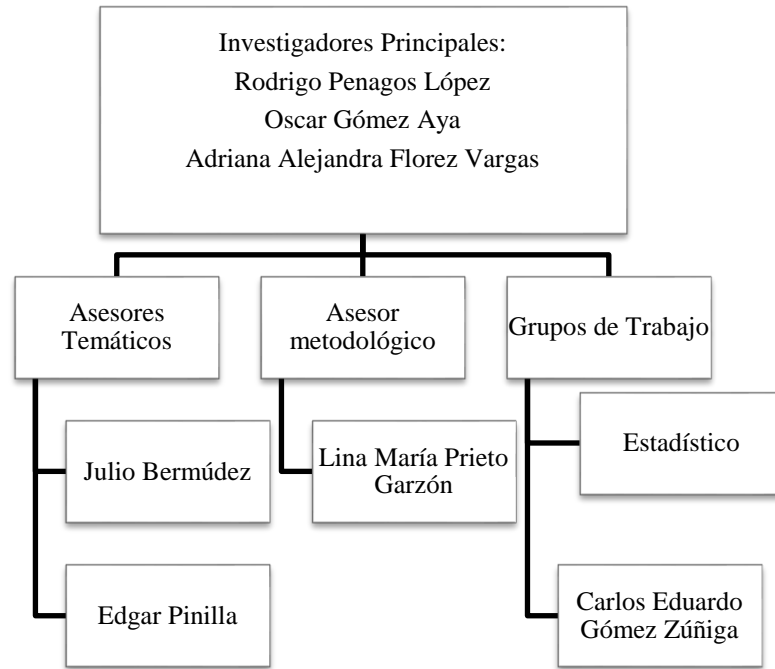
Teniendo en cuenta que todas las variables son de tipo cuantitativo de razón, se evaluaron el número total de axones mielinizados, la presencia de patrón de degeneración axonal, de patrón de regeneración axonal y la existencia de fibras de aspecto amielínico en cada uno de los sitios descritos. Se realizó una prueba t-student de igualdad de medidas con el supuesto de igualdad de varianza y normalidad de las variables. Para el análisis se utilizó la herramienta “Análisis de Datos” de Excel.

Aspectos Éticos

Conforme a la Ley 84 de diciembre de 1989 que dictamina el Estatuto Nacional de Protección de los Animales y la resolución 008430 de octubre de 1993 la cual marca la pauta para la práctica en investigación con el uso o empleo de animales, la investigación se realizó con los animales en un hábitat saludable, en condiciones óptimas garantizadas por el Bioterio de la Universidad El Bosque. El tamaño de muestra es el mínimo necesario para realizar una estimación precisa de los brotes axonales.

La eutanasia de los ratones se realizó sin crueldad, sufrimiento o agonía. Autorizada por el Comité de Ética de la Facultad de Medicina de la Universidad El Bosque y la Fundación Santa Fe de Bogotá. La eutanasia fue necesaria pues al realizar la resección del nervio se alteró de manera definitiva e irreversible la movilidad de la extremidad implicada del animal en experimentación con el consecuente deterioro de la calidad de vida del respectivo animal.

Organigrama



Cronograma

fecha límite	Descripción
01 de abril de 2013	protocolo escrito
01 de mayo de 2013	inicio de intervenciones
01 de junio de 2013	fin de intervenciones
01 de septiembre 2013	inicio de toma de muestras y procesamiento
01 de octubre de 2013	análisis de patologías
15 de Diciembre de 2013	análisis de la información
01 de Enero 2014	realización de trabajo escrito

PRESUPUESTO

					<i>ORIGEN</i>	
<i>RECURSOS</i>	<i>COSTO</i>	<i>CANTIDAD</i>	<i>UNIDAD</i>	<i>TOTAL</i>	<i>RECURSO</i>	
Personal (investigadores, asesores)	5000000			5000000	Investiga dor	
Equipos (alquiler computador, maquina)	2000000			2000000	Investiga dor	
MATERIALES						
Ratas	28000	12	Animal	336000	Bosque	U. El
Hospedaje Bioterio	69200	12		830000	Bosque	U. El
Alimento	5.000	10		50000	Bosque	U. El
Papel Kraft	1	1	Rollo	70000	Bosque	U. El
Contenedor de	30000	1		30000		U. El

Alimento						Bosque	
						U.	El
Jeringa de Insulina	200	200	Jeringa	40000	Bosque		
						U.	El
Acepromazina	150000	1	Frasco	150000	Bosque		
						U.	El
Xilazina	40000	3	Frasco	120000	Bosque		
						U.	El
Ketamina	50000	2	Frasco	100000	Bosque		
						U.	El
Gasas	350	100	Paquete	35000	Bosque		
						U.	El
Bisturí	20000	1	Caja	20000	Bosque		
						U.	El
Solución salina	2000	10	Bolsa	20000	Bosque		
						U.	El
Sutura 10-0	55000	10	unidad	550000	Bosque		
						U.	El
Sutura de piel 4-0	8000	10	Unidad	80000			
						U.	El

						Bosque	
						U.	El
Mercurio	1500	2	frasco	3000	Bosque		
						U.	El
Meloxicam	24600	1	ampollax3	24600	Bosque		
						U.	El
Jeringa de 3 cc	150	20	Jeringa	3000	Bosque		
						U.	El
Eutanex	55700	1	Frasco	55700	Bosque		
						U.	El
Guantes de manejo	10440	2	Caja	20880	Bosque		
						U.	El
Guantes estériles	1000	50	Caja	50000	Bosque		
						U.	El
Gorros quirúrgicos	162	50	Caja	8120	Bosque		
						U.	El
Tapabocas	200	50	Caja	10000	Bosque		
Misceláneos							

	AnálisisHistopatológic			U. El
o	120000	48	5760000	Bosque
				U. El
			Subtotal	8.366.300 Bosque
	TOTAL			15.366.300

RESULTADOS

Los resultados se analizaron con la herramienta Análisis de Datos de Excel, al aplicar la prueba t-Student con igualdad de medias e igualdad de varianza para muestras de distribución normal se obtuvieron los siguientes hallazgos:

Tabla 2. *Prueba t para dos muestras suponiendo varianzas iguales*

	<i>Grupo A</i>	<i>Grupo B</i>
Media	209,7142857	119,6666667
Varianza	786,2380952	1878,666667
Observaciones	7	6
Varianza agrupada	1282,796537	
Diferencia hipotética de las medias	0	
Grados de libertad	11	
Estadístico t	4,519041335	
P(T<=t) una cola	0,000436709	
Valor crítico de t (una cola)	1,795884819	
P(T<=t) dos colas	0,000873417	
Valor crítico de t (dos colas)	2,20098516	

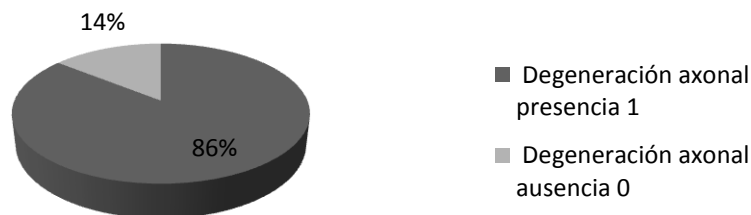
Teniendo en cuenta un valor de intervalo de confianza del 95 %, al aplicar la prueba t-studenta los valores del grupos A es decir la técnica de neurorrafia doble latero-lateralde los muñones proximal y distal del nervio peroneo, mediante ventana epineural en el nervio lesionado y sutura de éste al nervio tibial intacto previa realización de ventana epineural adicionándosele injerto nervioso en el defecto contra el grupo B con técnica de neurorrafia doble latero-lateralde los muñones proximal y distal del nervio peroneo, mediante ventana epineural en el nervio lesionado y sutura de éste al nervio tibial intacto

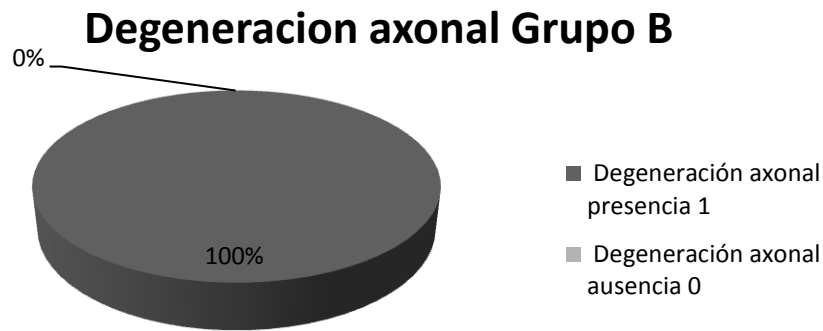
previa realización de ventana epineural sin adición de injerto nervioso, cuya media del grupo A es de 209.71 y la media del grupo B es de 119.66 , con un valor crítico de t (dos colas) de 2.2 y el estadístico de la prueba t de 4,5 encontramos que éste valor se ubica en la región rechazo. Teniendo en cuenta que el valor del Estadístico t es mayor que el valor crítico de t, hay suficiente evidencia para rechazar la hipótesis de igualdad de medidas, por lo tanto hay diferencia significativa entre los grupo A y B

En el grupo A, donde se realizó técnica de neurorrafia doble latero-lateral más uso de injerto encontramos un 86 % de degeneración axonal, comparado con el grupo B donde se realizó técnica de neurorrafia doble latero-lateral sin uso de injerto y donde la degeneración axonal fue del 100 %, (Figura 6).

Figura 6. *Distribución porcentual de la degeneración axonal en los grupos A y B*

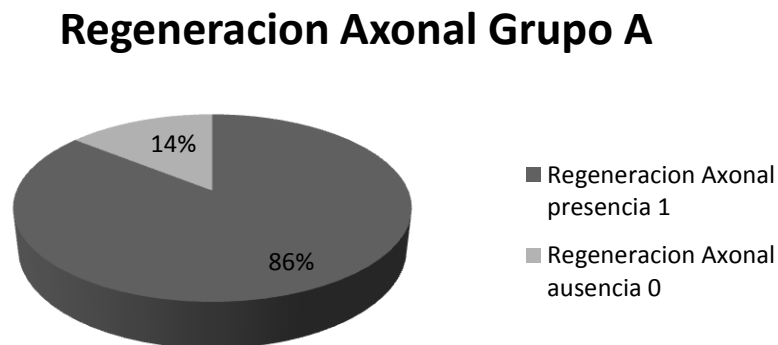
Degeneración axonal Grupo A



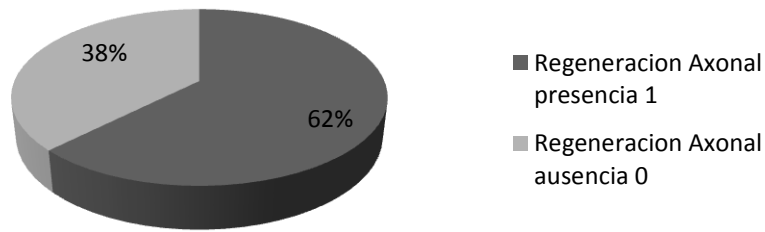


En el grupo A, donde se realizó técnica de neurorrafia doble latero-lateral más uso de injerto encontramos un 86 % de Regeneración axonal, comparado con el grupo B donde se realizó técnica de neurorrafia doble latero-lateral sin uso de injerto y donde la regeneración axonal fue del 62 %, (Figura 7).

Figura 7. Distribución porcentual de la Regeneración axonal en los grupos A y B



Regeneracion axonal Grupo B

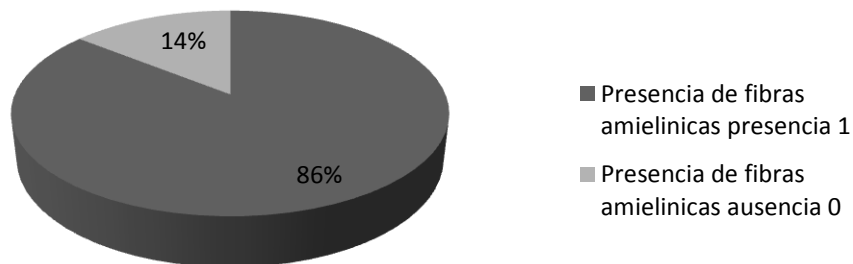


En el grupo A, donde se realizó técnica de neurorrafia doble latero-lateral más uso de injerto encontramos un 86 % de fibras amielínicas, comparado con el grupo B donde se realizó técnica de neurorrafia doble latero-lateral sin uso de injerto y donde la presencia de fibras amielínicas fue del 75 %, (Figura 8).

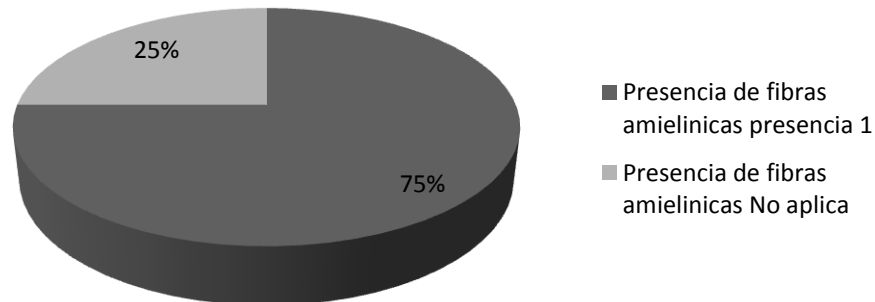
Figura 8. Distribución porcentual de las Fibras Amielínicas en los Grupo A y B

Presencia de fibras amielinicas Grupo

A



Fibras amielinicas Grupo B



En el grupo A, donde se realizó técnica de neurorrafia doble latero-lateral más uso de injerto encontramos a valorar la ultraestructura, axones con cambios degenerativos y en otras muestras axones de características normales, con fibras amielínicas y patrón de mielina normales alternados con cambios degenerativos. En algunas muestras se encontraron presencia de macrófagos.

En el grupo B donde se realizó técnica de neurorrafia doble latero-lateral sin uso de injerto encontramos cambios degenerativos axonales alternados con cambios regenerativos axonales, fibras amielínicas siempre presentes pero se hicieron evidentes células inflamatorias, especialmente macrófagos. En este grupo se presentó un caso de no integración evidente a la microscopia óptica de la neurorrafia doble latero-lateral sin injerto donde se observó crecimiento de axones por fuera del epineuro que se podría interpretar como falla en la técnica quirúrgica al no abrir bien el epineuro, por lo tanto esta muestra fue excluida de la tabla de datos.

DISCUSIÓN

Siendo la patología traumática de nervio periférico una entidad común en el ejercicio clínico del cirujano de mano y nervio periférico(9), a pesar de su manejo es constante la preocupación por el grado de discapacidad que estas lesiones pueden generar y el tiempo necesario para su recuperación (11).

En el estudio de la fisiopatología del nervio periférico encontramos compromiso de las dos estructuras más importantes que constituyen al nervio: el tejido conectivo y tejido nervioso. El tejido conectivo es el epineuro, perineuro y el endoneuro, que sirve de protección, aislamiento y organización de las fibras nerviosas(12). Las fibras nerviosas son las mínimas unidades funcionales del nervio. Estas se dividen en fibras mielínicas donde cada una está rodeada por una vaina de mielina producida por una célula de Schwann, y las fibras amielínicas, donde varios grupos de fibras nerviosas están rodeadas por una sola célula de Schwann la cual no produce una vaina de mielina(15). En el caso de las lesiones completas del nervio, la conducción nerviosa se puede ver alterada no sólo por la interrupción del crecimiento axonal sino además por el aumento en el porcentaje de tejido conectivo, fibrosis o tejido cicatrizal que pueden bloquear o alterar la migración de los brotes axonales. (16).

En la investigación actual se demostró que el uso de injerto utilizado en la neurorrafia doble latero-lateral(Grupo A) estimula positivamente la formación de brotes axonales, comparado con la neurorrafia doble latero-lateral sin injerto (Grupo B). Esto se demuestra porque al utilizar la herramienta “Análisis de Datos” de Excel los resultados fueron que el Estadístico de prueba t es igual a 4.5 y el valor crítico de t (dos colas) es de

2.20; se considera que el valor del Estadístico de prueba t se ubica en la región crítica, por lo tanto se concluye que se rechaza la hipótesis de igual de medias y se acepta la hipótesis que hay diferencia entre el grupo A y B.

Cuando se evaluó el número de axones en el extremo distal del nervio peroneo del Grupo A el promedio de axones fue de 209.7, comparado con el número de axones del Grupo B cuyo promedio fue 119.6, se encontró una diferencia estadísticamente significativa con una p (dos colas) de 0.0008. Dichos hallazgos se interpretaron como una mejoría en la proporción de las fibras nerviosas con respecto al tejido conectivo observados en las muestras de microscopia óptica. Esto nos permite proponer para próximos estudios como hipótesis “si el utilizar injerto evita una pérdida significativa de brotes axonales y evita una mayor formación de colágeno”.

El tejido conectivo aumentado en el espacio intersticial del nervio periférico altera la difusión de nutrientes desde el sistema capilar a la célula nerviosa y de desechos desde ella al capilar, alterando la homeostasis de la neurona y limitando la formación de brotes axonales. (16)

Considerando los resultados citados en la neurorrafia latero lateral del Dr. Zhang sobre la formación de brotes axonales en el nervio lesionado (13), nuestra investigación demostró la presencia de los brotes axonales con la misma técnica. Sin embargo en nuestro artículo el promedio de brotes axonales fue de 209.7 del Grupo A, contra el promedio de 449.6 del grupo C (Técnica Gold Standard). Podemos concluir que la técnica de neurorrafia doble latero – lateral con injerto es una opción para el manejo de lesiones de nervio periférico asociadas a un defecto pero no supera al uso de la técnica Gold Standard.

CONCLUSIONES

Ante una lesión de nervio periférico donde encontremos un defecto que no permita la neurorrafia termino terminal sin tensión, una alternativa de manejo podría ser la neurorrafiable latero – lateral, que al adicionarle un injerto de nervio aumenta el número de brotes axonales y disminuye la formación de tejido conectivo, mejorando así elpronóstico de dichas lesiones.

La neurorrafiable latero-lateral podría contemplarse como una alternativa de manejo para las lesiones de nervio periférico donde no sea posible aplicar la técnica Gold Standard.

El uso de injerto de nervio se asocia a una presencia mayor de brotes axonales durante la cicatrización del nervio lesionado.

REFERENCIAS

- (1) Vekris MD, Soucacos PN. Update on peripheral nerve microsurgery. *Microsurgery* 2006; 26(4):216-217.
- (2) Lee SK, Wolfe SW. Peripheral nerve injury and repair. *J Am Acad Orthop Surg* 2000 Jul-Aug;8(4):243-252.
- (3) Flores AJ, Lavernia CJ, Owens PW. Anatomy and physiology of peripheral nerve injury and repair. *Am J Orthop (Belle Mead NJ)* 2000 Mar;29(3):167-173.
- (4) Deal DN, Griffin JW, Hogan MV. Nerve conduits for nerve repair or reconstruction. *J Am Acad Orthop Surg* 2012 Feb;20(2):63-68.
- (5) Seddon H. *Surgical Disorders of the Peripheral Nerves*,. 2nd ed. New York: Churchill Livingstone; 1975.
- (6) Lykissas MG. Current concepts in end-to-side neurorrhaphy. *World J Orthop* 2011 Nov 18;2(11):102-106.
- (7) Stipp-Brambilla EJ, Viterbo F, Labbe D, Garbino JA, Bernardelli MM. Double muscle innervation using end-to-side neurorrhaphy in rats. *Sao Paulo Med J* 2012;130(6):373-379.
- (8) Viterbo F, Amr AH, Stipp EJ, Reis FJ. End-to-side neurorrhaphy: past, present, and future. *Plast Reconstr Surg* 2009 Dec;124(6 Suppl):e351-8.
- (9) Saadat S, Eslami V, Rahimi-Movaghar V. The incidence of peripheral nerve injury in trauma patients in Iran. *Ulus Travma Acil Cerrahi Derg* 2011 Nov;17(6):539-544.
- (10) Portincasa A, Gozzo G, Parisi D, Annacontini L, Campanale A, Basso G, et al. Microsurgical treatment of injury to peripheral nerves in upper and lower limbs: a critical review of the last 8 years. *Microsurgery* 2007;27(5):455-462.
- (11) Lee SK, Wolfe SW. Peripheral nerve injury and repair. *J Am Acad Orthop Surg* 2000 Jul-Aug;8(4):243-252.
- (12) Green D. Traumatic Brachial Plexus Injury. In: Elsevier, editor. *Operative Hand Surgery*. 6th ed. New York: Churchill Livingstone; 2011. p. 1235-1292.
- (13) Zhang S, Ji F, Tong D, Li M. Side-to-side neurorrhaphy for high-level peripheral nerve injuries. *Acta Neurochir (Wien)* 2012 Mar;154(3):527-532.
- (14) Ray WZ, Mackinnon SE. Management of nerve gaps: autografts, allografts, nerve transfers, and end-to-side neurorrhaphy. *Exp Neurol* 2010 May;223(1):77-85.

- (15) Maravilla KR, Bowen BC. Imaging of the peripheral nervous system: evaluation of peripheral neuropathy and plexopathy. *AJNR Am J Neuroradiol* 1998 Jun-Jul;19(6):1011-1023.
- (16) Gocmen S, Sirin S, Oysul K, Ulas UH, Oztas E. The effects of low-dose radiation in the treatment of sciatic nerve injury in rats. *Turk Neurosurg* 2012;22(2):167-173.
- (17) Lykissas MG, Korompilias AV, Batistatou AK, Mitsionis GI, Beris AE. Can end-to-side neurorrhaphy bridge large defects? An experimental study in rats. *Muscle Nerve* 2007 Nov;36(5):664-671.
- (18) Deal DN, Griffin JW, Hogan MV. Nerve conduits for nerve repair or reconstruction. *J Am Acad Orthop Surg* 2012 Feb;20(2):63-68.
- (19) Viterbo F, Trindade JC, Hoshino K, Mazzoni Neto A. Latero-terminal neurorrhaphy without removal of the epineural sheath. Experimental study in rats. *Rev Paul Med* 1992 Nov-Dec;110(6):267-275.
- (20) Viterbo F, Teixeira E, Hoshino K, Padovani CR. End-to-side neurorrhaphy with and without perineurium. *Sao Paulo Med J* 1998 Sep-Oct;116(5):1808-1814.
- (21) Viterbo F, Salvio AG, Griva BL, Maciel FO. The embracing end-to-side neurorrhaphy in rats. *Acta Cir Bras* 2012 Mar;27(3):260-265.
- (22) Haninec P, Kaiser R, Dubovy P. A Comparison of collateral sprouting of sensory and motor axons after end-to-side neurorrhaphy with and without the perineurial window. *Plast Reconstr Surg* 2012 Sep;130(3):609-614.
- (23) Lundborg G, Zhao Q, Kanje M, Danielsen N, Kerns JM. Can sensory and motor collateral sprouting be induced from intact peripheral nerve by end-to-side anastomosis? *J Hand Surg Br* 1994 Jun;19(3):277-282.
- (24) Jaber FM, Abbas BP, Nezhad ST, Tanideh N. End-to-side neurorrhaphy: an experimental study in rabbits. *Microsurgery* 2003;23(4):359-362.
- (25) Jaeger MR, Braga-Silva J, Gehlen D, Pereira-Filho Gde A, Zettler CG, de Souza MA, et al. End-to-end versus end-to-side motor and sensory neurorrhaphy in the repair of the acute muscle denervation. *Ann Plast Surg* 2011 Oct;67(4):391-396.
- (26) Yuksel F, Karacaoglu E, Guler MM. Nerve regeneration through side-to-side neurorrhaphy sites in a rat model: a new concept in peripheral nerve surgery. *Plast Reconstr Surg* 1999 Dec;104(7):2092-2099.
- (27) Vergara-Amador E. Combined nerve transfers in the treatment of upper brachial plexus injuries. *Revista Cubana de Ortopedia y Traumatología* 2012;26(2):128-142.