

Anexos

Anexo 1. Instrumento de recolección

Rata No.	
Peso (g)	
No. de axones mielinizados en el extremo proximal del nervio peroneo (A)	
No. de axones mielinizados en el extremo distal del nervio peroneo (B)	
No. de axones mielinizados en el extremo proximal del nervio tibial (C)	
No. de axones mielinizados en el extremo distal del nervio tibial (D)	

**PATRÓN DE REGENERACIÓN AXONAL DE DOBLE
NEURORRAFIA TERMINO-LATERAL EN UN MODELO
EXPERIMENTAL EN RATAS**

Camilo José Romero-Barreto¹

Francisco Javier Aguilar-Sierra¹

Adriana Alejandra Florez-Vargas²

¹ Ortopedista y traumatólogo, Fellow de Cirugía de Mano Universidad El Bosque, Bogotá. Colombia.
Dr.Camiloromero@gmail.com faguilar@javeriana.edu.co

² Patóloga, Fundación Santa Fe de Bogotá, Bogotá. Adrianaflorezv@hotmail.com

Las lesiones de nervio periférico con defecto segmentario en la actualidad continúan siendo un reto para los microcirujanos, existiendo diferentes alternativas con resultados de pronóstico variable. El desarrollo de un modelo experimental en el cual se realice una neurorrafia termino-lateral doble permite el manejo de defectos neurales con mejor pronóstico y menor morbilidad. Se planteo evaluar el patrón de regeneración axonal mediante la medición del número total de axones mielinizados, grupo de regeneración y la presencia de fibras con morfología semejante amielínicas. Se planteo un modelo experimental en ratas con el cual se determino la coaptación termino-lateral demostrando cuántos axones viables sobrepasan la doble anastomosis y su relación con el número de axones en los nervios intactos, tanto del receptor como del donante mediante el estudio histopatológico de los segmentos proximales y distales del nervio afectado lesionado por análisis histológico. Se utilizaron para el estudio 7 ratas winstar, a las cuales se realizaron el modelo empleando los nervios tibial y peroneo respectivamente previa resección de 1cm en el nervio peroneo creando un defecto

significativo. Posterior a 8 semanas se obtuvieron muestras teniendo como resultado diferencias significativas en la cantidad de axones y fibras de morfología amielínica entre los cabos proximales y distales indicando un patrón de regeneración axonal adecuado; Así mismo no existieron diferencias en la cantidad de grupos regenerativos indicando un patrón homogéneo de reparación. Teniendo como conclusión, que esta técnica puede ser una valiosa herramienta en el tratamiento de defectos neurales disminuyendo la morbilidad producidas por un injerto así como la posibilidad del desarrollo de neuromas residuales.

Palabras Claves: neurorrafia, neurorrafia termino-lateral, regeneración neural, nervio periférico, neuroma.

ABSTRACT

Peripheral nerve lesions with segmental defect currently remain a challenge for microsurgeons, several alternatives exist forecast results variable. The development of an experimental model in which perform a termino-lateral neurorrhaphy

double allows neural defect management with better prognosis and lower morbidity. Aim was to evaluate the pattern of axonal regeneration by measuring the total number of myelinated axons, regeneration group and the presence of unmyelinated fibers with similar morphology; we proposed an experimental model in rats to determine the pattern of neural regeneration through histopathological examination of the proximal and distal segments of the affected nerve. We used for the study 7 Wistar rats, which were made to the model using tibial and peroneal nerves respectively after resection of 1cm in the peroneal nerve creating a significant defect. 8 weeks after the procedure, we evaluated sample from each segment resulting in significant differences in the number of axons and unmyelinated fibers morphology between the proximal and distal end indicating proper axonal regeneration pattern; Likewise there were no differences in the amount of regenerative groups indicating a homogeneous pattern of repair. In conclusion, this technique can be a

valuable tool in the treatment of neural defects decreasing morbidity produced by a graft and the possibility of the development of residual neuromas.
Keywords: neurorrhaphy, termino-lateral neurorrhaphy, neural regeneration, peripheral nerve neuroma.

1. Introducción

Las lesiones de nervio periférico en la actualidad representan un reto para el cirujano y a pesar de los avances en la microcirugía, aún se requieren más estudios para el mejorar los resultados funcionales de estas lesiones. El reparo termino-lateral es una de las nuevas herramientas que se está desarrollando para el manejo de ciertas lesiones nerviosas, especialmente en aquellas donde existen grandes defectos en los que el uso de injertos muy largos podría llegar a ser poco práctico debido a su asociación con fibrosis intraneural y atrofia del órgano blanco en virtud del tiempo prolongado para la reinervación¹

El mecanismo por el cual se regeneran los axones en la neurorrafia termino-lateral y más aún, el efecto sobre el nervio donante, es motivo de controversia. Con este estudio se

pretendió aumentar la evidencia respecto a la utilidad de la doble coaptación termino-lateral demostrando cuántos axones viables sobrepasan la doble anastomosis y su relación con el número de axones en los nervios intactos, tanto del receptor como del donante mediante el análisis histológicos a través de microscopia óptica de alta resolución en los segmentos proximales y distales correspondiente a cada nervio.

Al demostrar la viabilidad de una cirugía donde se haga una doble neurorrafia termino-lateral en los pacientes con lesiones de nervio periférico, se disminuirían los tiempos de cirugía considerablemente, porque no se necesitará lesionar otra zona del cuerpo, al no ser necesario tomar injerto de una zona donante.

2. Metodología

Realizamos un estudio experimental utilizando 7 ratas de la raza Wistar que se mantuvieron en el bioterio de la Universidad El Bosque, bajo supervisión, en condiciones estándar, a una temperatura ambiente promedio de 18°C, con adecuada ventilación, con un ciclo luz-oscuridad de 12x12 horas, con una humedad relativa del 55% y con un macroambiente libre de ruido, con tasa de intensidad menor a 65dB. Se dispuso de habitáculos fijos de un área de 4x3.6 metros, en jaulas independientes cada una de 30x30cm, en condiciones de esterilidad con paneles desmontables, de fácil limpieza y mantenimiento. La alimentación se basó en concentrado balanceado para los requerimientos metabólicos altos de las ratas, con una cucharadita diaria de aceite vegetal para evitar tricobezoares y con acceso ad libitum al agua.

Intervención Quirúrgica

Se procedió a realizar la intervención quirúrgica en el laboratorio de microcirugía de la Universidad El Bosque bajo anestesia general con pentobarbital sódico 30-50mg/kg intraperitoneal, se realizó rasurado del área glútea del lado asignado y asepsia con preparado de metanolal 70% más yodopovidona. Los procedimientos se realizaron bajo magnificación binocular usando microscopio quirúrgico con técnica microquirúrgica. Se realizó una incisión vertical de 2cm de longitud en el glúteo y se disecó en profundidad hasta identificar el nervio ciático y sus dos ramas principales: el nervio peroneo y el nervio tibial. Luego el nervio tibial se seccionó 1cm distal a la bifurcación y se reseco un segmento de 1cm para crear una brecha entre los extremos distal y proximal del mismo.

El extremo proximal del nervio tibial se anastomoso, mediante una ventana epineural, en un lado del nervio peronero intacto, usando la técnica de sutura termino-lateral con nylon monofilamento 10/0. El extremo distal del nervio tibial será anastomoso a otro segmento del nervio peronero usando la técnica de sutura termino-lateral con nylon monofilamento 10/0, pero a diferencia de la coaptación realizada para el extremo proximal, en éste se le realizo axotomía al nervio peronero en el área de la coaptación. La incisión se suturo por planos con sutura monofilamento nylon 4/0.

A las 8 semanas de la intervención, con los animales bajo anestesia general en la forma descrita, se realizo la toma de muestra de los segmentos distal y proximal del nervio tibial 3mm proximal a la coaptación y de los segmentos distal y proximal del nervio

peronero 3mm proximal y distal, respectivamente, a la coaptación. Bajo anestesia general, se inducirá la eutanasia con sobredosis de pentobarbital intracardiaco.



Foto 1. Disección del nervio peronero y tibial.

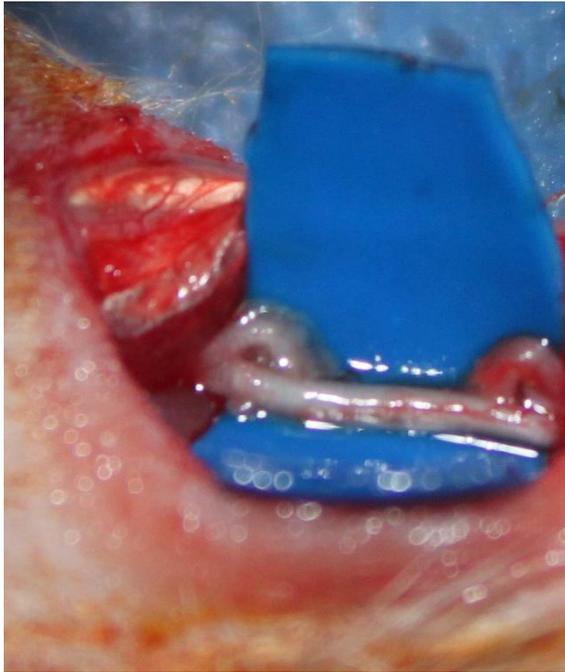


Foto 2. Doble neurorrafia termino-lateral

Procesamiento de las Muestras

El análisis histológico de las muestras se realizó en el laboratorio de microscopia electrónica de transmisión del Departamento de Patología de la Fundación Santa Fe de Bogotá. Las 28 muestras de nervio de aproximadamente 3mm al momento de ser recolectadas, se colocaron en un vial de plástico de 15 mm con aproximadamente 10 veces el volumen que ocupa la muestra de

glutaraldehído (GLH) a 4°C. Las muestras fueron marcadas con un código alfanumérico teniendo en cuenta el espécimen del que se tomaron y del sitio exacto del nervio. Se procedió a realizar el proceso de fijación de las 28 muestras en GLH. Se fijaron con GLH al 4 % por 24 horas, posteriormente se lavaron con agua destilada o buffer.

Se realizó el proceso de Post-fijación con Tetróxido de Osmio al 1% durante 2 horas a 4°C, protegido de la luz. Se realiza la fase de Contraste pre-imbibición con Acetato de uranilo al 3% durante toda la noche. Posteriormente se llevaron las muestras al proceso de deshidratación con diferentes concentraciones de alcohol, luego se realizó el proceso de Infiltración con una mezcla 1:1 etanol absoluto: acetona, durante 15 minutos seguido por acetona pura por 15 minutos.

Posteriormente se hizo la Imbibición con una mezcla 1: 1 Acetona: resina durante 2 horas. Luego resina pura (Spurr) durante 2 horas posteriormente realizó la Inclusión de las muestras llenando los pozos del molde de inclusión con resina pura, fresca para la cantidad de muestras necesaria. Finalmente hicieron los rótulos de los bloques en papel blanco con lápiz, se cortaron y colocaron dentro de cada pozo para bloque.

El proceso de Polimerización consistió en colocar el molde en el horno, previamente caliente, a 70 °C, durante 16 a 24 horas posteriormente se realizó el desmolde a temperatura ambiente por 10 minutos.

Las muestras se procesaron siguiendo los controles de calidad que tienen establecidos en el Laboratorio de la Fundación Santa Fe. Los nervios se

procesaron en los tiempos y en las condiciones indicadas, así se obtuvieron resultados óptimos.

Finalmente el procedimiento de corte con micrótomo para muestras semi-finas se realizó utilizando un micrótomo según protocolo establecido lo cual permitieron obtener 5 a 7 cortes definitivos, aproximadamente de 1 micra de grosor. Se reconoció la calidad y el grosor del corte por su brillo y color tornasolado. Se alistó una lamina portaobjetos limpia con una gota pequeña de agua. Con el pelillo del otro lado del palito, se pescó los cortes y se colocaron sobre la gota de agua. Se puso a secar la lámina en la plancha, previamente caliente a 60°C por 10 minutos.

Posteriormente se realizó una coloración con azul de toluidina al 1% y se observó en el microscopio óptico de alta resolución.

Análisis de Variables

Las variables evaluadas de forma histológica fueron el número total de axones mielinizados en cada uno de los extremos descritos. Todas las variables fueron del tipo cuantitativo de razón. Se describieron los promedios de axones extrafasciculares e intrafasciculares, el recuento de grupos regenerativos y la presencia de fibras con morfología amielínicas; Se realizó una comparación de medias por medio de un test de t-student utilizando como paquete estadístico SPSS permitiendo establecer diferencias estadísticas mediante la comparación de las muestras obtenidas.

Aspectos Éticos

Basados en un marco legal del Estatuto Nacional de Protección de los Animales que fue otorgado por la Ley 84 de diciembre de 1989 y de la resolución

008430 de octubre de 1993 en la cual se dictan las directrices para la práctica en investigación con el uso o empleo de animales se planteó el desarrollo de un hábitat bajo condiciones adecuadas de movilidad, aseo, alimentación y luz siendo estas medidas garantizadas bajo el cuidado y protección del Bioterio de la Universidad El Bosque. Se garantizó la administración completa de los suministros alimenticios, medicamentos y bienestar que los ratones requieran para su desarrollo y crecimiento durante el periodo de observación e investigación.

Este protocolo fue presentado para aprobación en los comités de investigación y ética de la Fundación Santa Fe de Bogotá y de la Universidad El Bosque siendo aprobado para la realización sin ninguna recomendación.

3.Resultados

Los resultados de todas las variables examinadas fueron de distribución normal al aplicar la prueba de Kolmogorov – Smirnov. Por tanto, por medio de la prueba de t-student, se encontraron los hallazgos que se describen a continuación, según cada variable analizada. Se utilizó el software estadístico SPSS.

Número total de axones por área en mm²:

Al comparar el promedio del número total de axones del extremo proximal del nervio donante: A (247 ± 84.8) contra el número total de axones del extremo proximal del nervio receptor: B (189.42 ± 111.8), se encontró una diferencia estadísticamente significativa ($p < 0.001$) que indica un mayor número de axones en el segmento A. Así mismo, cuando se comparó el promedio

de axones del extremo distal del nervio donante: C (303.42 ± 118.81) contra el extremo distal del nervio receptor: D (230.14 ± 112.7) se encontró una diferencia significativa ($p < 0.001$) que implica un mayor número de axones en el segmento C.

Por otro lado, al comparar los promedios del número total de axones mielinizados entre los extremos proximal y distal del nervio donante, A y C respectivamente, se encontró una diferencia significativa ($p < 0.001$) a favor de mayor número de axones en el extremo distal C. A su vez, entre los extremos proximal y distal B y D del nervio receptor, hubo una significancia estadística ($p = 0.004$) a favor de una mayor presencia de axones en el extremo distal D.

Número total de grupos regenerativos por área en mm²:

Al comparar los promedios de la cantidad de grupos regenerativos entre los extremos proximales A (5.28 ± 6.47) y B (1.85 ± 4.09), no existió diferencia estadísticamente significativa ($p=0.074$); así mismo, al comparar los promedios de la cantidad de grupos regenerativos entre los extremos distales C (13.14 ± 17.24) y D (12.14 ± 18.93) no existió diferencia estadísticamente significativa ($p=0.09$). Entre tanto, al comparar las medias entre los extremos proximal y distal del nervio donante, A y C, no se encontró diferencia estadística ($p=0.074$) como tampoco se encontró ($p=0.276$) en el análisis de la cantidad de grupos regenerativos entre los extremos proximal y distal del nervio receptor B y D.

*Presencia de fibras amielínicas por
área en mm²:*

Al comparar la presencia de fibras amielínicas entre el segmento A (7.71 ± 2.62) y B (4.14 ± 4.29) existió diferencia estadística ($p<0.001$) a favor de una mayor presencia de fibras amielínicas en el segmento A. Al comparar entre C (11 ± 1) y D (7.85 ± 3.89) existió diferencia estadística ($p<0.001$) a favor de la presencia de fibras amielínicas en el segmento C, lo cual demuestra que hubo una mayor presencia de fibras amielínicas en el nervio donante que en el receptor. Por último, al comparar entre A y C, existió diferencia estadística ($p<0.001$) a favor de mayor presencia en el segmento distal C y al comparar entre B y D, existió una diferencia estadística ($p=0.002$) a favor de mayor presencia de fibras amielínicas en el segmento distal D.

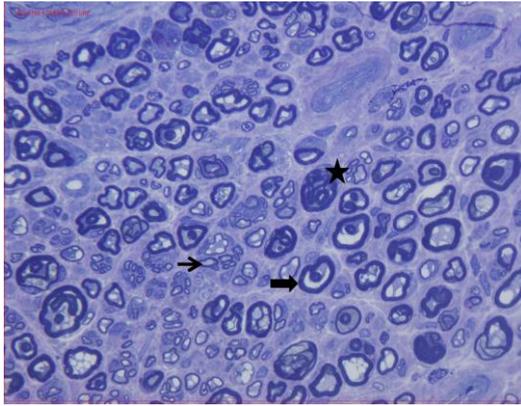


Foto 3 Extremo distal de un nervio receptor o peronero (D), distal a la anastomosis, a las 8 semanas del procedimiento. Nótese los axones (flecha negra gruesa), los grupos regenerativos (estrella negra) y las fibras de aspecto amielínico (flecha negra delgada).

4. Discusión

Las lesiones de los nervios periféricos son frecuentes. El desarrollo de nuevas técnicas microquirúrgicas acompañado del avance en el instrumental microquirúrgico y la evolución en la investigación de la fisiología de la regeneración nerviosa, han ayudado a

mejorar el pronóstico de los pacientes con lesiones de nervio periférico. A pesar de tener más de 100 años el tratamiento quirúrgico moderno de las lesiones con defecto o brechas de los nervios, hoy en día continúa siendo un problema en el área de la microcirugía.

En la última década se han realizado grandes esfuerzos para comprender la regeneración nerviosa y encontrar alternativas diferentes a la utilización del nervio autógeno.

La recuperación funcional después de una lesión de cualquier nervio periférico está determinada principalmente por dos factores, primero por el tiempo de reinervación de la placa motora y segundo por el número de axones regenerados que lleguen a ella.

Utilizar un injerto donante autólogo para colocarlo en el sitio del defecto nervioso, es la cirugía que generalmente

se realiza; pero esta se asocia con varias desventajas como la realización de otra incisión adicional para la toma de un nervio sensitivo sano, que lleva como resultado un déficit sensitivo del respectivo dermatoma, incrementando la morbilidad; generalmente la cantidad de injerto que se puede utilizar es limitada, sobretodo en casos de lesiones extensas o cuando hay compromiso de más de un nervio, lo que quiere decir que en los defectos mayores a 10cm existe un mal pronóstico de recuperación clínica.²

Para solucionar esto se han utilizado aloinjertos y conductos de diferentes materiales con el objetivo de reemplazar el injerto autólogo, pero se ha demostrado que la regeneración axonal no es posible en conductos acelulares, sin células de Schwann y sin factores de crecimiento, en conductos mayores a los 4cm de longitud³.

Por las múltiples desventajas mencionadas y por el mal pronóstico en las lesiones extensas es necesario buscar métodos alternativos en la reconstrucción del nervio periférico, como el planteado en esta investigación, donde estudiamos el patrón de regeneración axonal en una doble neurorafia termino-lateral, evitándose así la utilización de un injerto de nervio.

Diferentes modelos experimentales han demostrado la regeneración axonal en las neurorrafias termino-laterales, para que ocurra esto deben suceder tres cosas, que haya la inducción de brotes colaterales, que exista la habilidad axonal de cruzar varias capas y que se reajusten las motoneuronas que han adoptado la nueva unidad motora⁴.

Es conocido que en pequeños roedores puede existir en algunas ocasiones regeneración espontánea de los nervios,

por lo tanto en esta investigación se tuvo el cuidado de realizar una técnica microquirúrgica minuciosa para realizar las neurorafias y que la rafia proximal estuviera separada de la distal por lo menos un centímetro. Tal reconexión se evaluó al momento de la toma de las muestras para histología y no se encontró en ninguno de los casos.

La doble neurorafia termino-lateral nos ofrece varios beneficios, como se muestra en nuestra investigación. Primero, al no utilizar un injerto donante generamos menos morbilidad en la intervención quirúrgica. Segundo la adecuada regeneración axonal del nervio lesionado, sin lesión del nervio donante, y la disminución del riesgo de formación de neuromas en el cabo proximal lesionado, al realizarle una neurorafia termino-lateral como ya lo mostraba Aszmann et al, en su publicación.^{5,6,7,8,9,10}

El crecimiento axonal es el factor más importante para el adecuado resultado clínico en las lesiones de nervio periférico. El mecanismo exacto de la reinervación en las neurorafias termino-laterales no ha sido plenamente identificado. Trabajos de investigación como el que estamos desarrollando ayudan dilucidar un poco más sobre este tema.

En nuestra investigación las diferencias encontradas en los cabos proximales de los nervios (A y B), comparados con las muestras de los fragmentos distales (C y D) nos indican que existe una adecuada regeneración axonal de ambos nervios.

No existió diferencia estadísticamente significativa entre los grupos A y B, al ser los cabos nerviosos proximales sin lesión.

Además en los cabos distales (C y D) existen un mayor número en proceso de

regeneración, puesto que morfológicamente a nivel ultraestructural, dentro de las fibras descritas como de aspecto amielínico, se encuentran axones en proceso de mielinización, que no se identifican con claridad por el tiempo de regeneración que se estipuló para este trabajo. Estudios ultraestructurales más completos y con un mayor tiempo de seguimiento de reinervación serán llevados a cabo en próximas investigaciones.

La diferencia estadísticamente significativa entre las muestras de los segmentos distales C y D, a favor de C, se explica porque este es el nervio donante, en donde no existió una completa disrupción de las membranas basales de las células de Schwann, lo que explica mayor número axonal y a la vez regeneración nerviosa.

Se evidenció tanto en el conteo y en las características ultraestructurales del grupo C y D, un aumento del colágeno endoneural. Aunque este es un estudio controlado en ratas jóvenes, sin evidencia aparente de comorbilidades, y con tiempos entre la sección nerviosa y las neurografías muy cortos; la presencia de dicho aumento es un factor que nos permite suponer que los procesos de interacción nutricional entre los vasos endoneurales y la población axonal, se vean afectados, en contra del adecuado suministro y desecho de sustancias, pudiendo alterar el proceso de recuperación funcional, que es a donde apunta finalmente el resultado esperado. De ahí que extrapolando a los pacientes que necesitaran un procedimiento como este, los factores adicionales como comorbilidades y tiempo transcurrido para la realización del procedimiento pueden ser factores pronósticos

adversos en contra de la recuperación esperada tanto motora como sensitiva.

5. Conclusiones

Las lesiones de los nervios periféricos se presentan frecuentemente y hoy en día constituyen un reto en la microcirugía. Cuando existen defectos nerviosos extensos se necesitan injertos que conllevan a aumentar la morbilidad y no mejoran sustancialmente el

pronóstico. La doble neurorrafia termino-lateral puede ser una valiosa herramienta en las lesiones de nervio, ya que se demuestra una regeneración axonal adecuada, sin lesión del nervio donante, sin la comorbilidad de un injerto autólogo y disminuye la probabilidad de un neuroma al realizar una neurorrafia termino-lateral del cabo proximal.

Referencias

- ¹ 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-e358.
- ² Vekris MD, Soucacos PN. Update on peripheral nerve microsurgery. *Microsurgery*. 2006;26(4):216-7.
- ³ Lykissas MG. Current concepts in end-to-side neurorrhaphy. *World J Orthop*. 2011 Nov 18;2(11):102-6.
- ⁴ 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):664-71.
- ⁵ Aszmann OC, Korak KJ, Rab M, Grünbeck M, Lassmann H, Frey M. Neuroma prevention by end-to-side neurorrhaphy: an experimental study in rats. *J Hand Surg Am*. 2003 Nov;28(6):1022-8.
- ⁶ Bersaneti JA, Viterbo F, Jorge J, Denadai R. Muscle reinnervation in one or two stages?: experimental study in rats with end-to-side nerve graft. *Acta Cir Bras*. 2012 Dec;27(12):841-7.
- ⁷ Haninec P, Kaiser R, Dubový 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):609-14.

- ⁸ Kettle SJ, Starritt NE, Glasby MA, Hems TE. End-to-side nerve repair in a large animal model: how does it compare with conventional methods of nerve repair?. J Hand Surg Eur Vol. 2012 May 8.
- ⁹ Haninec P, Kaiser R. The end-to-side neurorrhaphy in axillary nerve reconstruction in patients with brachial plexus palsy. Plast Reconstr Surg. 2012 May;129(5):882e-3e.
- ¹⁰ Lykissas MG. Current concepts in end-to-side neurorrhaphy. World J Orthop. 2011 Nov 18;2(11):102-6.
- ¹¹ Yu Q, Lin ZK, Ding J, Wang T, Chi YL, Gao WY. Functional motor nerve regeneration without motor-sensory specificity following end-to-side neurorrhaphy: an experimental study. J Hand Surg Am. 2011 Dec;36(12):2010-6