

Sección IV. Investigación y Ciencias Básicas

Injertos nerviosos usando biotubos de dexón reabsorbibles (Estudio experimental en conejos)

Dr. Yolanda Restrepo R.*

En 40 conejos machos, se comparó la regeneración anatómica y funcional de un injerto nervioso convencional de 30 mm. de longitud, efectuado en el nervio ciático, con un injerto nervioso interponiendo un biotubo de dexón (ácido poliglicólico) (Davis-Geck) reabsorbible, de 30 mm. de longitud y 2 mm. de diámetro, suturado a los extremos proximal y distal. Los animales se sacrificaron por grupos 5 a 16 semanas después del procedimiento, para estudio histopatológico, haciendo cortes en los extremos proximal y distal y a través del biotubo vacío. Troncos nerviosos multifasciculares regeneraron desde el extremo proximal hacia el extremo distal del nervio. Para la estimación cualitativa se tomaron en cuenta: el espesor de la vaina de mielina y la regeneración axonal. Los resultados cuantitativos obtenidos se trataron por métodos gráficos de histogramas y métodos matemáticos en porcentajes.

A las mismas 5 y 16 semanas la actividad muscular, los potenciales evocados y las velocidades de conducción fueron registradas, observándose reinervación.

Introducción

La regeneración funcional después de una sección de un nervio periférico, es un proceso complejo dependiente de influencias locales y periféricas. La sección altera tanto la estructura nerviosa como el funcionamiento normal endoneural. Cuando la lesión de un nervio deja un espacio entre las estructuras nerviosas, la regeneración endoneural se produce, sea con un crecimiento desordenado de las fibras produciendo un neuroma, o con una dirección de las fibras del extremo proximal hacia el distal mal orientado, cuyo resultado final será una pobre reinervación muscular.

* Directora Programa de Posgrados Ortopedia y Traumatología, Universidad Nacional. Premio Investigación "José V. Bernal" XI Congreso SCCOT.

El uso de un injerto nervioso para reparar pérdidas de sustancia en un nervio, se inició desde 1870 con Philipeaux y Vulpian⁵, y fue más tarde popularizado por Seddon^{6,7}, Michon^{8,9} y Millesi^{1,2}. Los mecanismos básicos del proceso de mielinización en las fibras regeneradas han sido estudiados^{10,11,12} pero, los factores que intervienen en el control del crecimiento y la orientación de las fibras aún no están claros.

Sin embargo, la existencia de sustancias quimiotáxicas que impulsen el crecimiento de las fibras hacia distal, aún no ha sido completamente verificado.

Con los avances de la bioingeniería en la construcción de material ortopédico reabsorbible¹⁴, se inició también la investigación de la utilización de estos materiales en los nervios periféricos.

Numerosos estudios previos han utilizado diferentes materiales como injertos en los nervios periféricos, con variables resultados en cuanto a la regeneración^{15,16,17,18,19,20,21}.

En el presente estudio se creó un modelo experimental, en el cual los extremos seccionados del nervio ciático fueron suturados proximal y distalmente a un biotubo de dexón reabsorbible de 30 mm. de longitud, comparando la regeneración obtenida dentro de esta guía con un injerto nervioso convencional, de la misma longitud, efectuado en el lado contralateral.

Materiales y Métodos

El nervio ciático de 40 conejos machos fue utilizado para comparar un injerto nervioso interponiendo un biotubo reabsorbible en el lado derecho, con un injerto convencional como lo propuso Millesi⁸ en el lado izquierdo.

Cada extremidad del nervio ciático se reseco en una longitud total de 30 mm. Los tres gran-

des grupos fasciculares del nervio izquierdo, fueron injertados con un autoinjerto proveniente del lado derecho, utilizando el microscopio quirúrgico y suturados con nylon 10/0.

En el lado derecho, después de reseca en el nervio ciático una longitud de 30 mm., se cortó un biotubo de la misma longitud y de 2 mm. de diámetro. Los extremos proximales y distales fueron suturados utilizando el microscopio quirúrgico con nylon 10/0. La primera sutura se colocó en la pared posterior del extremo proximal y la anastomosis se completó según el método de triangulación.

La piel se cerró y no se dejó ninguna inmovilización externa. Los animales fueron dejados en libertad con una cerca de ladrillo, para evitar las úlceras infectadas que se producen en las patas al estar en jaulas debido al déficit sensitivo.

La regeneración nerviosa fue investigada desde la 4 hasta 16 semana con estudios histológicos y electromiográficos.

La Actividad Voluntaria Muscular, se registró en el gastrocnemius y el tibialis cranialis, con un electrodo de aguja concéntrica de 0.4 mm. de diámetro, introducida sobre la parte posterior de la pata. La respuesta evocada motora se efectuó en el gastrocnemius utilizando un electrodo bipolar de aguja con un diámetro de 0.45 mm., después de estimulación trascutánea con 75V y con una duración de 0.2m. La estimulación se hizo desde proximal hasta distal a lo largo del nervio tanto en el lado derecho como en el izquierdo.

Posteriormente los animales fueron sacrificados, y el nervio ciático de cada lado se fijó en Glutaraldehído en una solución buffer de cacodilato. Los segmentos del nervio se colocaron en Epon y se colorearon con azul II. Secciones transversales de 1 micrón de espesor fueron efectuadas a lo largo del injerto y 3 mm. distales al sitio de sutura, tanto en el biotubo como en el control.

Las secciones fueron examinadas con microscopio de luz, y se hizo una estimación cuantitativa de la vaina de mielina y el cilindroeje.

Áreas seleccionadas fueron cortadas para microscopia electrónica, teñidas con Acetato de Uranil y Solución de Reynolds.

Se efectuó un análisis univariado haciendo una estimación cuantitativa del diámetro de las fibras, midiendo el espesor de la vaina de mielina y considerando ésta como la única variable.

Una vez preparadas las láminas de los cortes, se procedió a hacer mediciones del número de fibras, el ancho de cada una de ellas y el ancho de su respectivo cilindroeje. Estas mediciones se hicieron a través de una ventana inspección de características estándar para todas las observaciones. El nivel de mielinización se determinó como el porcentaje promedio de superficie mielinizada de la fibra entre las zonas media y distal. Una vez hechas todas estas mediciones, se agruparon por tiempo (semanas) y a cada grupo de datos se le obtuvo la media aritmética y la varianza.

Desde el punto de vista estadístico, se estableció la distribución de frecuencia de las distintas fibras midiendo el espesor de la vaina de mielina, la estimación de la media y la varianza.

Posteriormente se efectuó un análisis de diferencia de las varianzas a partir de la homologación de las distribuciones "t" de Student y F de Fischer, con un nivel de significancia = 0.005.

Para comparar las medidas de los dos grupos se utilizó un histograma, en el cual, el número de fibras (eje X) se comparó con el diámetro de las fibras (eje Y).

Esta estimación se calculó en porcentajes y cada valor promedio entre 0-16 micrones se registró en el computador.

Resultados

Hallazgos histológicos: Después de ocho semanas, la sección trasversal de la parte media tanto del biotubo como del injerto convencional se muestran en la Fig. 1 A.B. Éstas representan los cambios vistos al microscopio de luz, en el biotubo (A) pueden observarse numerosos minifascículos rodeados por una abundante proliferación de fibroblastos. Si comparamos los dos lados, hay una mielinización menor en el biotubo, pero parece tener una mejor organización, existe un incremento en la vascularización en el biotubo indicada por el mayor número de vasos vistos.

Las secciones de la parte media en la semana 11, muestran regeneración en el biotubo. El ta-

maño de las fibras es pequeño y la envoltura de mielina aún es muy delgada, los dos grupos son similares.

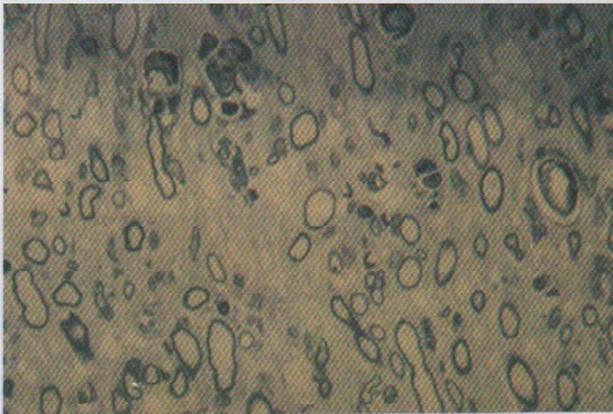
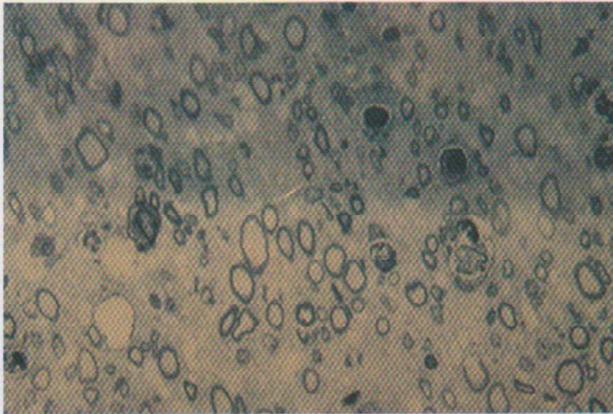


Fig. 1 A y 1 B. Muestra el proceso de regeneración en la parte media del biotubo y del control.

Después de quince semanas puede observarse la típica apariencia de un nuevo tronco nervioso. Los fascículos están finamente unidos con fibroblastos concéntricos y colágeno, rodeados por una aparente envoltura similar al epineurium. Fig. 2 A.B. (A biotubo).

Con mayor magnificación se evidencia la regeneración de la vaina de mielina. Puede suponerse que al interponer un biotubo como injerto nervioso se puede lograr una maduración satisfactoria.

El Histograma de la Fig. 3 muestra la distribución de las frecuencias absolutas de los diámetros de las fibras seccionados en la parte media, expresados en micrones cuadrados. Esta distribución presenta los avances detectados en el proceso de regeneración.

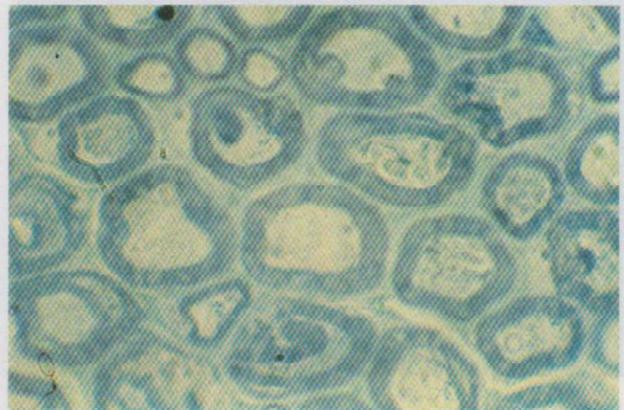
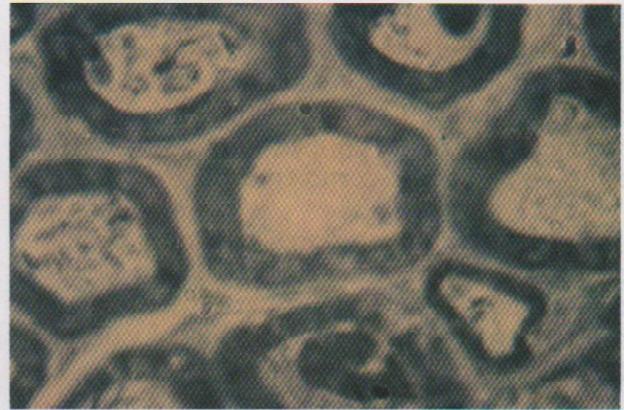


Fig. 2 A y 2B. Puede observarse que la regeneración de la mielina es similar en los dos grupos.

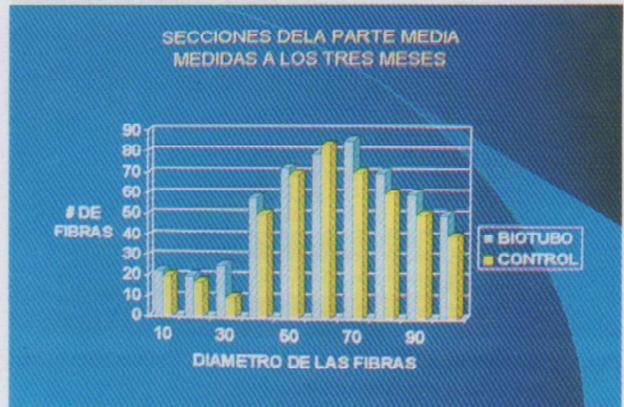


Fig. 3. Compara el número de fibras por mm² y el diámetro de las fibras (μ²)

Las Figuras 4 y 5 presentan la distribución de las frecuencias relativas (en porcentaje) del área de la envoltura de mielina encontrada en las secciones de la parte media y distal respectivamente, a los tres meses, expresados en micrones cuadrados.

El porcentaje en valores relativos para las fibras con un diámetro superior a 7 micrones, fue

de 76.26%. La Gráfica muestra un aumento relativo del número de fibras mielinizadas con mayor diámetro en la parte media comparativamente con la parte distal, posiblemente por una menor regeneración distal en este período de tiempo, tanto en el biotubo como en el injerto control.

En las figuras anteriores podemos observar que tanto en el biotubo como el injerto convencional, las secciones de la parte media y distal mostraban una regeneración nerviosa y un aceptable número de envolturas.



Fig. 4 y 5. Distribución de la envoltura de Mielina Micrones², medida a los tres meses.

Hallazgos electromiográficos

Desde el punto de vista electrodiagnóstico, a partir de la quinta semana se obtiene una respuesta evocada en el grupo de estudio luego de la estimulación eléctrica trascutánea. Antes de este tiempo sólo se observan, a la electromiografía de aguja, abundantes signos de inestabilidad de membrana muscular y demás características de la denervación aguda.

Hacia la sexta semana ya se identifican potenciales de acción de unidad motora de baja amplitud y corta duración, evidencia de la actividad de reinervación, las cuales están más claramente definidas hacia la octava semana como puede apreciarse en la Figura 6. Esta actividad de reinervación, como se deriva del análisis de los trazos electromiográficos, está más clara y definida en el grupo del biotubo que en el control.



Fig. 6. Actividad de reinervación en los dos grupos.

En etapas posteriores, la actividad de reinervación continúa y sigue siendo más precoz, organizada y madura en el grupo del biotubo.

Hacia la semana dieciséis, Figura 7, se observan potenciales de acción de unidad motora de mayor voltaje y duración, evidencia electrofisiológica de una reinervación exitosa. Se aprecian también, potenciales de acción de gran amplitud y corta duración, correspondientes a la activación de fibras musculares a partir de gemación colateral, fenómeno observado sólo en el grupo del biotubo.



Fig. 7. Adecuada reinervación en los dos grupos

Discusión

En la búsqueda de métodos ideales para reparar pérdidas nerviosas, la utilización de injertos homólogos^{22, 23, 24}, injertos pretratados^{25,26,27}, injertos heterólogos^{28,29}, y envolturas de diferentes tipos^{19,20,21,30,31} han sido investigados. La gran cantidad de métodos existentes indica que no hay ninguno que sea absolutamente satisfactorio. Los estudios de Lundborg^{19, 20} han demostrado que los axones son capaces de encontrar el camino correcto a través de una cámara mesotelial vacía. Con los biotubos reabsorbibles también es posible obtener regeneración a través de ellos.

Clásicamente, se ha dicho que los axones regeneran utilizando los viejos tubos endoneurales; principalmente Sunderland³² ha esbozado la importancia de los viejos tubos endoneurales o membranas basales que proveen conductos guías para la regeneración de los axones. En este experimento, los axones se dejaron libres en un solo tubo guía vacío, para encontrar el camino hacia distal y efectuar su propia organización, no exis-

tían tubos endoneurales por los cuales las fibras crecieran. Esto también confirma los estudios de Lundborg con la cámara Mesotelial y Restrepo²¹ con el perineurium vacío.

En este estudio, el análisis Histológico muestra que las fibras regeneradas aparentemente se organizan con un patrón fascicular, que se parece a la estructura de un nervio normal. En los estadios iniciales existe una excesiva actividad fibroblástica, sin embargo, éstos no indican fibrosis sino un estado de la maduración de la vaina de mielina. Esto está de acuerdo con los resultados obtenidos por Cabaud³³ y confirma el crecimiento y maduración de las fibras.

En conclusión, los resultados de este estudio experimental muestran que la utilización de tubos reabsorbibles como guías de injertos nerviosos es técnicamente posible. Por tanto, se debe continuar con este tipo de investigaciones orientándolas a la posible aplicación en los seres humanos, lo cual es útil por la prevalencia creciente de las lesiones completas de nervio periférico en humanos y la necesidad de mejorar los resultados finales obtenidos con otras técnicas y disminuir el número de secuelas, en especial los déficit sensitivos que aunque mínimos están presentes en la zona donante.

Bibliografía

1. **Millessi H**, *The interfascicular nerve grafting of the median and ulnar nerves*. J. Bone Joint Surg {Am} 54: 727-50, 1972.
2. **Millessi H**, *Microsurgery of peripheral nerves*, Hand 5: 157-60, 1973.
3. **Millessi H**, Fascicular nerve repair and interfascicular nerve grafting. In Daniel R., Terziz J., editors: *Reconstructive Surgery*, Boston, 1977, Little, Brown / Co. Págs. 430-42.
4. **Michon J**, Nerve suture today. In Michon J., Moberg E., editors: *Traumatic nerve lesions*, Edinburg, London, New York, 1975, Churchill Livingstone, Ltd., págs. 79-89.
5. **Philippeaux JM, Vaupian A**, *Note sur des essais de greffe d. un tronc du nerf lingual entre deux bouts du nerf hipoglosse apres excision d. un segment de ce dernier nerve*. Arch Physiol Norm Pathol 3: 618-620, 1970.
6. **Seddon HJ**, *The use of autogenous grfts for the repair of large gaps in peripheral nerves*, Br J. Surg 35: 151-159, 1947.
7. **Seddon HJ**, *Nerve grafting*. J Bone Joint Surg {Br} 45: 447-452. 1963.

8. Michon J, Moberg E. *Les lésions traumatiques des nerfs périphériques*. Monographies du Groupe d'Etude de la Main. Expansion scientifique française. Paris, 1973.
9. Michon J, Masse P. Le momento optimun de la suture nerveuse dans les plais du membre superior. *Rev Chir Orthop* 50. (2) 205-210, 1964.
10. Aguayo AJ, Charron L, Bray GM. *Potencial of schwann cells from unmyelinated nerves to produce myelin; a quantitative ultrastructural and radiographic study*. *J. Neurocytol*, 5. 565-573. 1976.
11. Aguayo AJ, Epps J, Charron L, Bray GM. *Multipotenciality of schwann cells in cross-anastomosed and grafted myelinated and un-myelinated nerves: quantitative microscopy and radioautography*. *Brain Research*, 104: 1-20. 1976.
12. Weinberg HJ, Spencer PS. *Studies on the control of myelinogenesis II. Evidence for neuronal regulation of myelin production*. *Brain Research*, 113: 363-378. 1976.
13. Rayner SRW. *The origin and nature of pseudosynovium appearing around implanted silastic rods: an experimental study*. *Hand*, 8: 101-109. 1976.
14. Mooney DJ, Organ G, Vacanti JP, Langer R. *Design and fabrication of biodegradable polymer devices to engineer tubular tissues*. *Cell-Transplant*, 3 (2): 203-210, 1994.
15. Berger A, Lassner F, Schaller E. *The delon tube in injuries of peripheral nerves*. *Handchir-Microchir-Plast Chir*, 269 (1): 44-47. 1994.
16. Keeley R, Atagi T. *Peripheral nerve regeneration across 14 mm. gaps: a comparison of autograft and entubulation repair methods in rats*. *J. Reconstr-Microsurg*, 9 (5): 349-360. 1993.
17. Best TJ, Machinnon SE, Bain JR, Makino A. *Verification of a free vascularized nerve graft model in the rat with application to the peripheral nerve allograft*. *Plast reconstr surg*, 92 (3): 516-525. 1993.
18. Brunelli GA, Vignasio A, Brunelli GR. *Different conduits in peripheral nerve surgery*. *Microsurg*, 15 (3): 176-178. 1994.
19. Lundborg G, Hasson HA. *Nerve regeneration through preformed pseudosynovial tubes*. *J. Hand Surg*, 5 (1): 35-38. 1980.
20. Lundborg G, Dahlin LB, Danielsen N. *Nerve regeneration across an extended gap: a neurobiological view of nerve repair and the possible involvement of neurotrophic factors*. *J Hand surg* 7 (6): 580-587. 1982.
21. Restrepo Y, Merle M, Michon J. *Fascicular nerve grafts using an empty perineurial tube: an experimental study in the rabbit*. *Microsurg* 4: 105-112. 1983.
22. Afanassieff A, Recht P. *Resultats de 44 homogreffes de nerfs conserves par le cialit*. *Ann Chir Plast* 16: 284-287. 1971.
23. Sanders FK. *The repair of large gaps of the peripheral nerves*. *Brain* 65: 181-189. 1942.
24. Sunderland S, Bradley KC. *Stress strain phenomena in human peripheral nerve trunks*. *Brain* 84: 102-106. 1961.
25. Edshage S, Niebauer JJ. *Evaluation of freezing as a method to improve cut surfaces in peripheral nerve preparatory to suturing*. *Plastreconstr Surg* 37: 196-202. 1966.
26. Seddon HJ. *Nerve grafting*. *J. Bone Joint Surg {Br}* 45: 447-452. 1963.
27. Weiss P, Taylor AC. *Repair of peripheral nerves by grafts of frozen-dried nerve*. *Proc Soc Exp Biol Méd* 52: 326-357. 1944.
28. Gutman E, Sanders FK. *Functional recovery following nerve grafts and other types of nerve bridge*. *Brain* 65: 373. 379. 1942.
29. Sanders FK. *The repair of large gaps in the peripheral nerves*. *Brain* 65: 281-294. 1942.
30. Ducker TB, Hayes GJ. *Experimental improvements in the use of silastic cuff for peripheral nerve repair*. *J Neurosurg* 28: 582-587. 1968.
31. Young JZ, Medawar PB. *Fibrin suture of peripheral nerves*. *Lancet* 2: 126-132. 1940.
32. Sunderland S. *Factors influencing the course of regeneration and the quality of the recovery after nerve suture*. *Brain* 75: 19-28. 1952.
33. Cabaud He, Rodkey W, Nemerh TJ. *Progressive ultrastructural changes after peripheral nerve transection and repair*. *J Hand Surg* 7: 353-365. 1982.