

Injertos nerviosos de tubos perineurales vacíos vascularizados en la reparación de nervio periférico

Estudio experimental en conejos

Yolanda Restrepo Renjifo*

Resumen

En el nervio ciático de 48 conejos machos, se comparó la regeneración anatómica y funcional de un injerto nervioso convencional con un tubo perineural vacío vascularizado, de 30 mm de longitud, con un injerto de las mismas características con el pedículo vascular seccionado. Los animales se sacrificaron por grupos 1 a 16 semanas después del procedimiento. Se efectuaron microangiogramas para analizar la revascularización de los injertos identificando los vasos epineurales, endoneurales y perineurales.

Para los estudios histológicos se hicieron cortes en el extremo distal del nervio y a través del tubo perineural vacío. Troncos nerviosos multifasciculares regeneraron hasta 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 con histogramas y métodos matemáticos en porcentajes.

Estudios histoquímicos musculares con succinil dehidrogenasa mostraron regeneración de las fibras tipo I y II en ambos grupos. A las mismas 4 y 16 semanas la actividad muscular y los potenciales evocados fueron registradas, observándose reinervación.

Introducción

Los nervios periféricos requieren una suplencia local de energía para mantener sus funciones. Esta energía depende del flujo axoplásmico y del sistema vascular intraneural, que a su vez está reforzado por los vasos segmentarios provenientes del sistema vascular extrínseco^{9, 10, 19}. Interferencias con la vascularización del nervio dan lugar a una alteración compleja de la energía del nervio, seguida por la interrupción de la propagación del impulso nervioso. Sin embargo, cuando el flujo intraneural se recupera rápidamente, los cambios producidos por el déficit en la energía nerviosa son indetectables. Al contrario, cuando un nervio se secciona, la isquemia se produce inmediatamente, interrumpiendo la suplencia de energía del nervio por completo llevándolo al deterioro de la función.

Después de la reparación, la regeneración nerviosa depende, en parte, de la rápida revascularización. Existen dos posibles caminos para esta revascularización: a partir de vasos que tienen origen en los extremos seccionados del nervio que se anastomosan con vasos provenientes del injerto, o bien, a partir de vasos provenientes de los tejidos circundantes que se anastomosan con los vasos del injerto¹⁹. De acuerdo con Weiss y Taylor, para garantizar la supervivencia de un injerto, la circulación debe restablecerse en pocos días³⁷.

Han sido informados numerosos estudios experimentales sobre la importancia de la vascularización^{12, 13, 14, 25, 27}. Algunos autores sostienen que la formación de anastomosis vasculares (revascularización) entre los extremos del nervio y el injerto, se inicia en los injertos con pedículo vascular a las 72 horas, mientras que los injertos no vascularizados o libres, tardan seis o más días en iniciar el proceso^{1, 16, 24, 31}.

De otro lado, ha sido demostrado que los nervios periféricos pueden regenerar a través de di-

* Profesora asociada a la Unidad Especializada de Ortopedia, Universidad Nacional de Colombia, Facultad de Medicina Unidad de Ortopedia Hospital San Juan de Dios.

ferentes clases de tubos o conductos^{20, 26, 28} y numerosos estudios han utilizado diferentes materiales como injertos en los nervios periféricos, con resultados variables en cuanto a la regeneración^{26, 28}.

En el presente estudio, se creó un modelo experimental para evaluar si la preservación del pedículo vascular (sistema extrínseco) de los injertos de perineurio vacío se asocia a una revascularización precoz y a una regeneración nerviosa más temprana.

Hipótesis

La utilización de un tubo perineural vacío vascularizado para reparar una pérdida nerviosa, puede lograr la misma o mejor regeneración que la obtenida con un autoinjerto no vascularizado de las mismas características.

Materiales y métodos

El nervio ciático de 48 conejos machos de peso entre 2.0 y 2.8 kg, fue utilizado para comparar el resultado morfológico y funcional, de un injerto de un tubo perineural vacío vascularizado, con un injerto no vascularizado de las mismas características, efectuado en el lado contralateral.

En cada extremidad del animal, el nervio ciático se reseco en una longitud total de 30 mm. En el lado derecho, el injerto vascularizado se preparó con la siguiente técnica: después de identificar el pedículo vascular en el lado proximal del nervio (Figura 1); éste fue seccionado proximal y distalmente al pedículo sin retirarlo de su sitio en una longitud de 30 mm. La permeabilidad del pedículo y la viabilidad del injerto se establecieron comprobando el sangrado en los extremos del nervio seccionado. Una vez identificados los fascículos, se extrajo el contenido intraneural del perineurio mediante una tracción suave ejercida en el lado proximal, retirando parcialmente los fascículos del primer grupo fascicular (Figura 2). Para facilitar la identificación del perineurio que se encuentra colapsado, se instiló una gota de azul de metileno en el extremo distal. La primera sutura guía fue colocada en la pared posterior del extremo distal efectuando una sutura epiperineural entre el tubo vacío y el fascículo del extremo distal del nervio. La sutura se efectuó siguiendo el método de triangulación. (Figura 3).

La primera sutura guía fue colocada en el lado proximal entre el tubo perineural y un grupo fascicular del extremo del nervio seccionado (Figura 4) y posteriormente se terminó de retirar el fascículo para completar la sutura. (Figura 5).

Los otros dos fascículos fueron retirados y suturados en la misma forma. Fue mandatorio efectuar un cierre hermético interponiendo los puntos necesarios para evitar el escape de los axones en crecimiento y la formación de un neuroma lateral. (Figura 6).

En el lado izquierdo, el injerto se preparó en la misma forma: se identificó el pedículo proximal y se seccionó, suprimiendo la vascularización del injerto; posteriormente se efectuó un injerto perineural vacío con la misma técnica que en el lado contralateral.

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

La revascularización fue evaluada mediante estudios angiográficos, la regeneración nerviosa con registros electromiográficos y posteriormente los nervios preparados para las tinciones histológicas. Estudios histoquímicos del músculo tibial anterior, permitieron diferenciar la denervación y la reinervación de las fibras musculares.

Los estudios electromiográficos fueron hechos desde la cuarta semana después de la operación hasta la semana dieciséis. El estudio de la actividad muscular voluntaria se verificó en el *gastrocnemius* y en el *tibialis cranialis* con una aguja electrodo concéntrica de 0.45 mm. de diámetro colocada en la parte posterior de la pata. La respuesta evocada se obtuvo en el *gastrocnemius* con una aguja electrodo bipolar, por medio de estimulación trascutánea de 75 V y con una duración de 0.2 ms.

Para los estudios angiográficos, histológicos e histoquímicos los animales fueron sacrificados en grupos 1 a 16 semanas después de la intervención. Antes del sacrificio, se aplicaron 500 UI/kg. de peso de heparina intravenosa y el sistema vascular del nervio ciático fue preparado por infusión de sulfato de bario en la aorta según el

método descrito por Edshage en 1964⁹ y otros autores^{2,9,18}. Microangiogramas de alta resolución fueron elaborados y fotografiados como lo describen los mismos autores. Los vasos epineurales, perineurales y endoneurales fueron identificados y registrados.

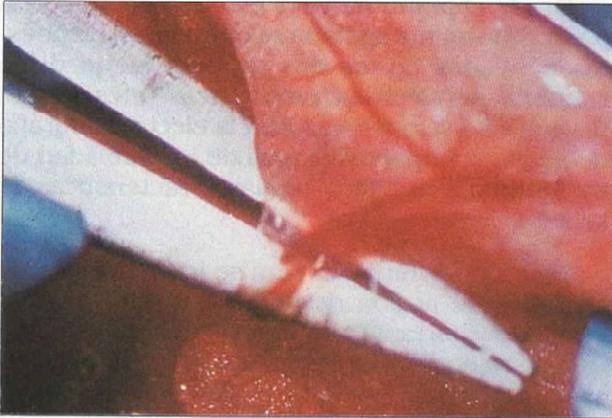


Fig 1. Identificación del pedículo vascular

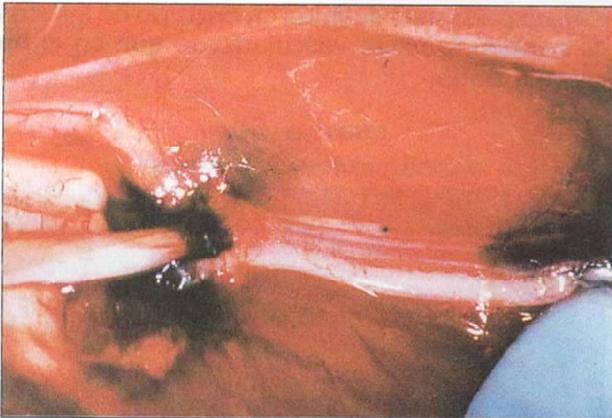


Fig 2. Extracción del contenido intraneural



Fig 3. Sutura del tubo perineural con el extremo distal.

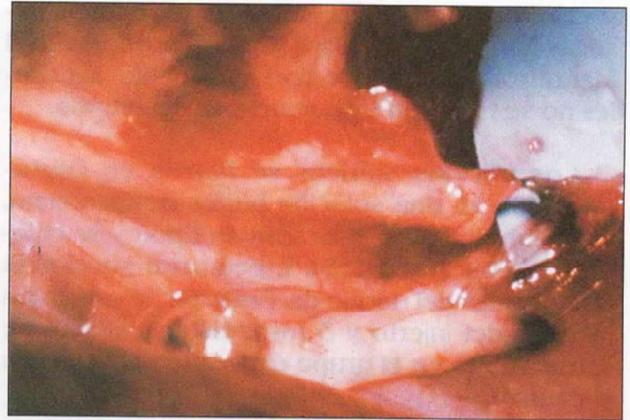


Fig 4. Sutura de la pared posterior en el extremo proximal.

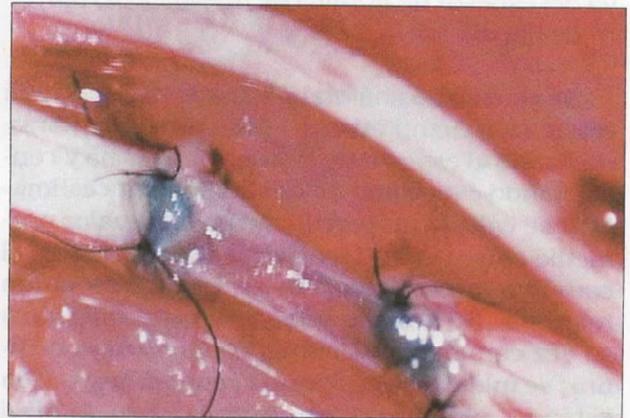


Fig 5. Sutura del primer tubo perineural y los extremos nerviosos



Fig 6. Sutura terminada de todos los tubos extremo distal.

A partir de la cuarta semana, el músculo tibial anterior se disecó al mismo tiempo que se tomaron los nervios para la histología. Este músculo está compuesto de diferentes tipos de fibras musculares y con métodos histoquímicos para la

succinil dehidrogenasa (SDH) pueden diferenciarse las fibras tipo I y tipo II. Sin embargo, es difícil identificar las fibras de tipo intermedio, las cuales no se tomaron en cuenta en este estudio.

Los nervios ciáticos se fijaron en Glutaraldehído en una solución buffer de cacodilato. Los segmentos se colocaron en Epon y se colorearon con Azur II. Se efectuaron secciones transversales del nervio de 1 micrón de espesor a lo largo del injerto y 3 mm. distales al sitio de sutura, tanto en el grupo experimental como en el control.

Las secciones fueron examinadas al microscopio de luz y se hizo una estimación cuantitativa del espesor de la vaina de mielina y del número de fibras.

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 única variable. Esta estimación se calculó en porcentajes y cada valor promedio entre cero y 16 micrones se registró en el computador. Las medidas se verificaron en un tektronix, (R) modelo 4050, que está equipado a su vez con una tabla numérica. El número de fibras se midió a través de una ventana inspección estándar para todas las observaciones. El nivel de mielinización se determinó como el porcentaje promedio entre el eje mayor y menor de la fibra de mielina. Una vez hechas todas las mediciones, se agruparon por tiempo (semanas) y en cada grupo de datos se obtuvo la media aritmética y la varianza.

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 mismas (eje Y). Se analizaron las láminas histológicas de la parte media y de la porción distal de los injertos nerviosos con tubos de perineurio vacío tanto de los vascularizados como de los no vascularizados.

Resultados

Electromiografía

El factor más relevante en los estudios electromiográficos fue la presencia constante de actividad voluntaria después de la novena semana, en los dos grupos.

Desde el punto de vista electrodiagnóstico, a partir de la quinta semana se obtuvieron respuestas evocadas en los dos grupos, luego de la estimulación eléctrica trascutánea. Antes de este tiempo sólo se observaron, a la electromiografía de aguja, abundantes signos de inestabilidad de membrana muscular y demás características de la denervación aguda.

Hacia la séptima semana se identificaron 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 7a, 7b).

Esta actividad de reinervación, como se deriva del análisis de los trazos electromiográficos, está un poco más definida en el grupo de injertos de perineurio vacío vascularizado que en el no vascularizado.

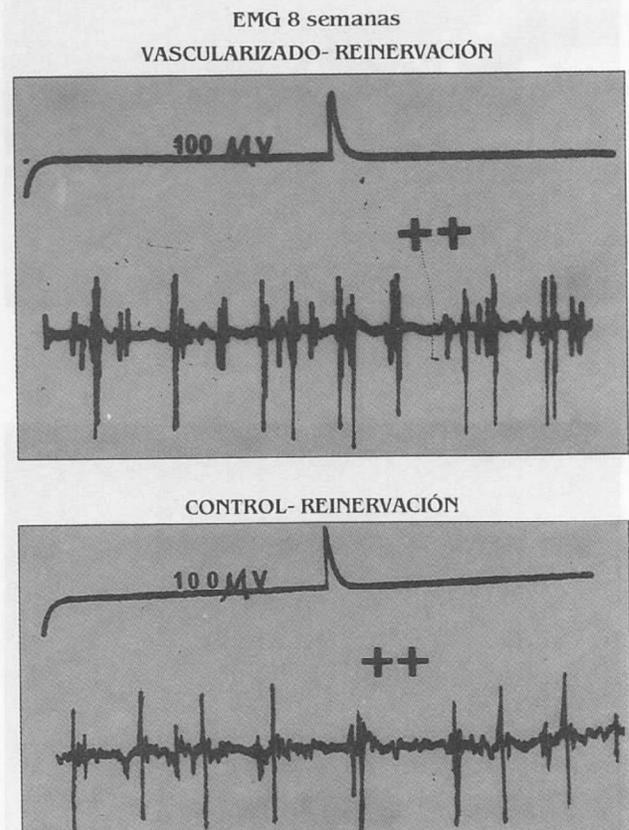


Fig. 7a y Fig. 7b. Actividad de reinervación en los dos grupos.

Hacia la decimosexta semana (Figura 8a, 8b) se observaron potenciales de acción de unidad motora de mayor voltaje y duración, en el grupo de injertos vascularizados. La actividad de reinervación siguió siendo más organizada en este grupo.

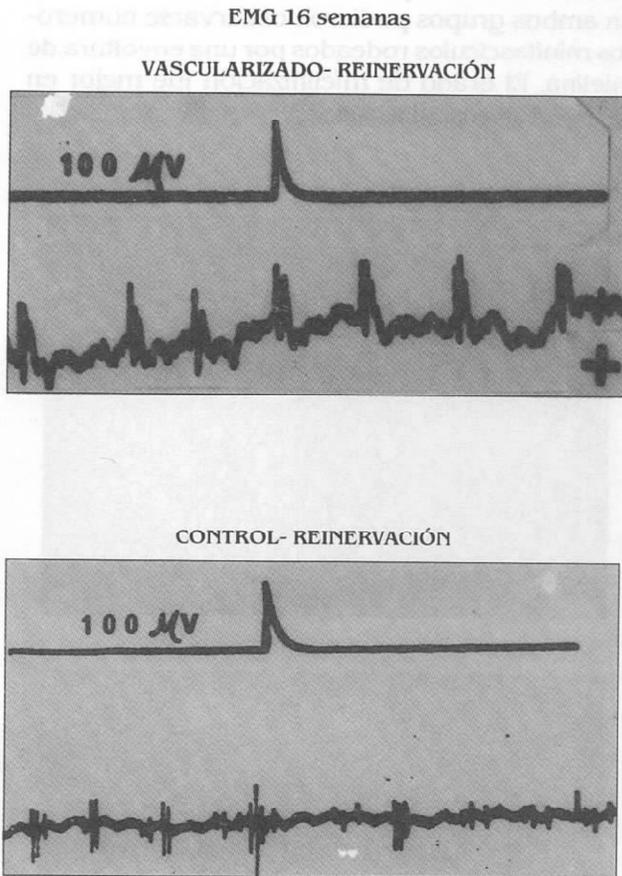


Fig. 8a y Fig. 8b. Actividad de reinervación en los dos grupos.

Hallazgos microangiográficos

Los hallazgos microangiográficos se muestran en la Tabla 1. En los estudios iniciales de la microangiografía, se vieron al segundo día algunos vasos endoneurales.

El número de nervios con vasos epineurales o endoneurales aumentó diariamente durante la primera semana.

Se pudieron identificar anastomosis proximales y distales después de la primera semana en ambos grupos. Estas anastomosis continuaron siendo más numerosas en el injerto vascularizado. Existen pocas anastomosis entre el injerto y los extremos del nervio seccionado, pero éstas son más numerosas en el injerto vascularizado. (Figura 9a, 9b).

Se muestran angiogramas de los dos lados en la Figura 10a, 10b que corresponden a la segunda semana. La apariencia fue similar, sin embargo, se observaron más vasos en el injerto vascularizado. Los estudios angiográficos sugirieron que la revascularización ocurrió con anastomosis proximales y distales mucho más precozmente en los injertos con tubos perineurales vascularizados.

Hallazgos histológicos

En la primera semana un gran número de macrófagos, linfocitos y polimorfonucleares, fue-

Tabla 1
Hallazgos microangiográficos

DÍAS	2		3		4		5		6		7		8		9		10		11		13		15	
V: VASCULARIZADO	C: NO VASCULARIZADO		V	C	V	C	V	C	V	C	V	C	V	C	V	C	V	C	V	C	V	C	V	C
NÚMERO DE NERVIOS OBSERVADOS	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4
INJERTOS CON VASOS EPINEURALES	2	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
INJERTOS CON VASOS ENDO Y/O PERINEURALES	0	0	1	0	1	0	2	1	2	1	2	1	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
ANASTOMOSIS PROXIMALES	0	0	0	0	1	0	2	1	1	1	2	1	2	1	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
ANASTOMOSIS DISTALES	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	1	0	1	1	2	1	2	1	2	1	2	2	2	1
ANASTOMOSIS DISTALES Y PROXIMALES	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	1	0	1	1	2	1	2	1	2	1	2	2	2	1

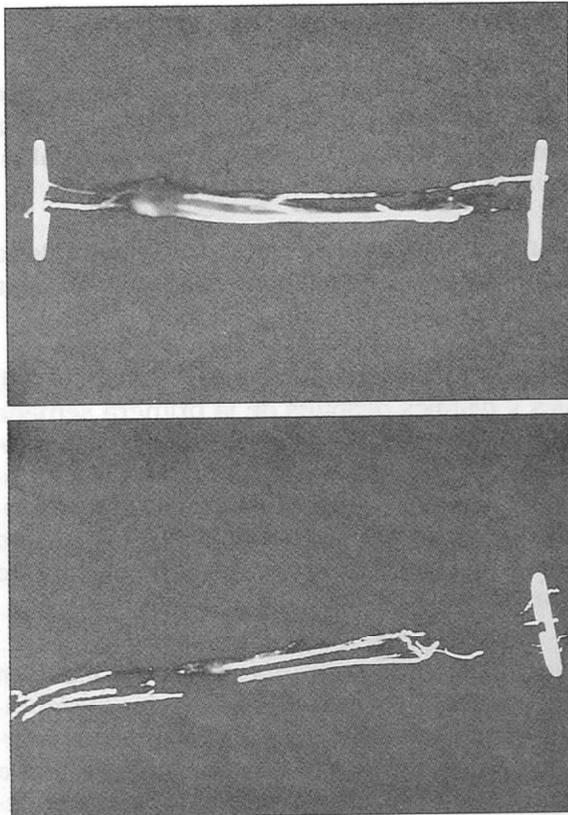


Fig. 9. Vasos epineurales. A. Injerto vascularizado.

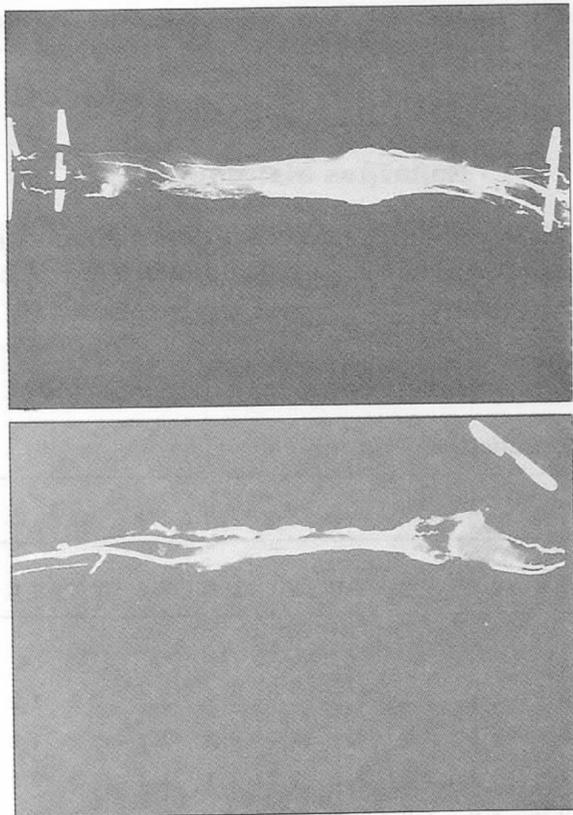


Fig. 10. Anastomosis con los extremos nerviosos. A. Injerto vascularizado.

ron observados en los dos grupos. Sin embargo esta respuesta celular fue superior en los injertos vascularizados.

Secciones transversales de la parte media de los tubos perineurales vacíos se muestran en la Figura 11a, 11b. Estos representan los cambios vistos al microscopio de luz a las ocho semanas. En ambos grupos pudieron observarse numerosos minifascículos rodeados por una envoltura de mielina. El grado de mielinización fue mejor en los injertos vascularizados.

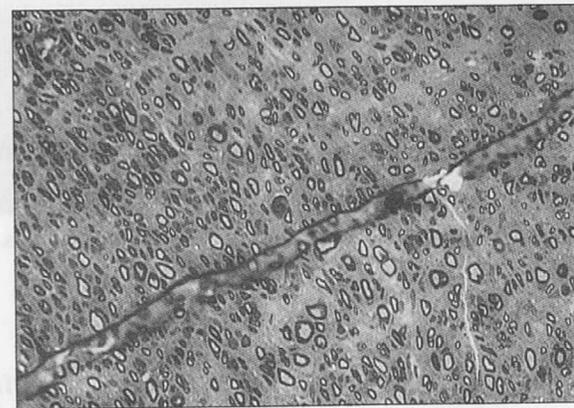
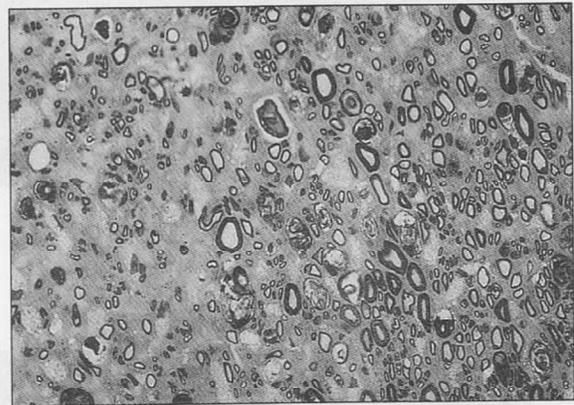


Fig. 11a y Fig. 11b. Muestra el proceso de regeneración en la parte media del tubo vascularizado y del control.

Después de quince semanas (Figura 12a, 12b) se detectó la típica apariencia de un nuevo tronco nervioso. Los fascículos se vieron finamente unidos con fibroblastos y colágeno, rodeados por una aparente envoltura similar al epineurio. Sin embargo, al comparar la maduración de las fibras de los dos grupos, los injertos vascularizados habían alcanzado una mejor maduración de las mismas.

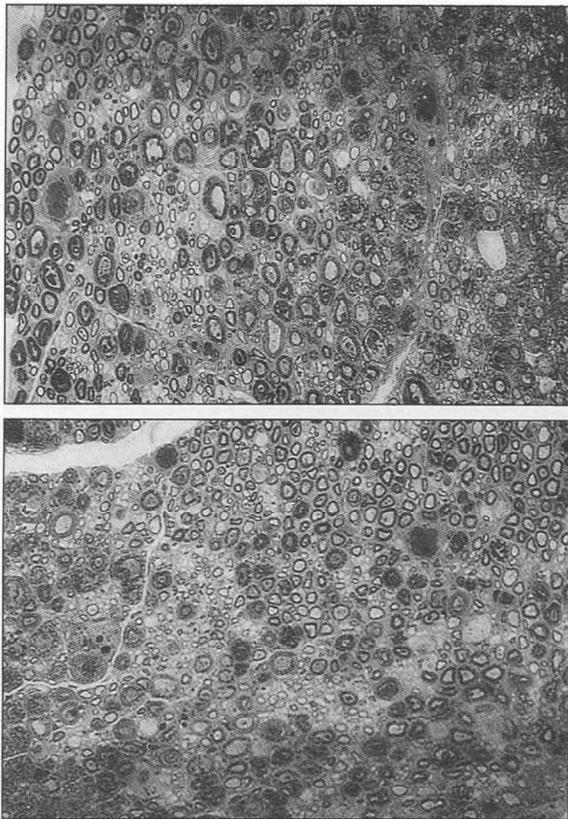


Fig. 12a. Fig. 12b. Puede observarse que la regeneración de la mielina es similar en los dos grupos.

El histograma de la Figura 13, muestra la distribución de las frecuencias absolutas de los diámetros de las fibras seccionadas en la parte media, expresados en micrones cuadrados. Esta distribución presenta los avances detectados en el proceso de regeneración.

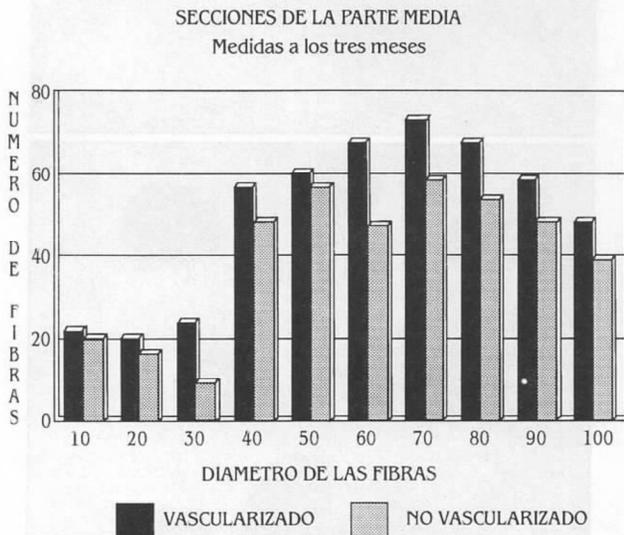


Fig. 13 Compara el número de fibras por mm² y el diámetro de las fibras.

Las figuras 14 y 15 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.

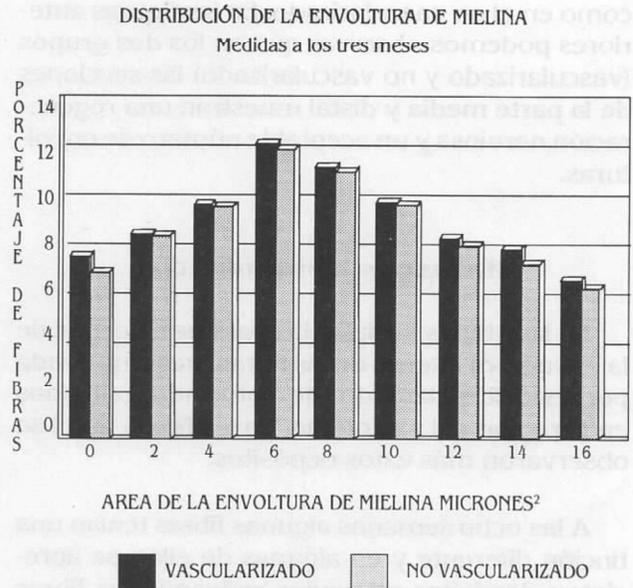


Fig. 14 Parte media

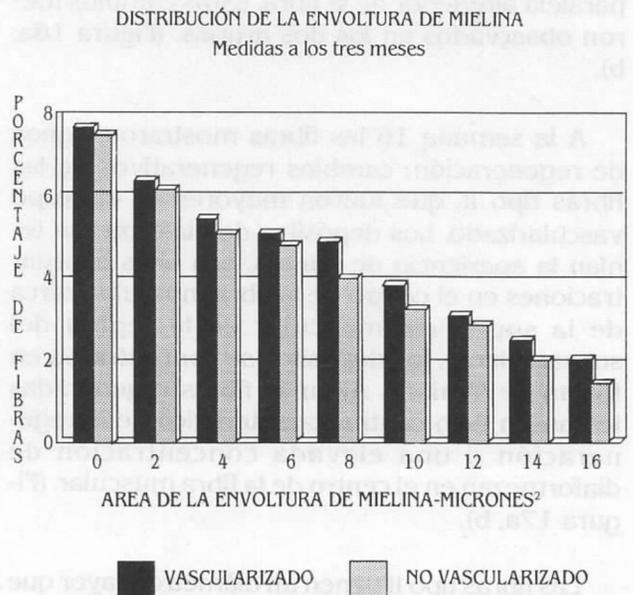


Fig. 15 Compara el número de fibras por mm² y el diámetro de las fibras.

El porcentaje de valores relativos para las fibras con un diámetro superior a 7 micrones, fue de 68.26%. 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 tubo perineural vacío vascularizado como en el no vascularizado. En las figuras anteriores podemos observar que en los dos grupos (vascularizado y no vascularizado) las secciones de la parte media y distal muestran una regeneración nerviosa y un aceptable número de envolturas.

Hallazgos histoquímicos

En las etapas iniciales la apariencia normal de la estructura interna de las fibras fue remplazada por depósitos alargados de diaformeazan situados en la región del sarcolema. En las fibras tipo I se observaron más estos depósitos.

A las ocho semanas algunas fibras tenían una tinción diferente y en algunas de ellas, se apreciaron depósitos alargados rodeando las fibras diferentes a las existentes en el músculo normal, las cuales no contienen el tipo de depósitos descritos anteriormente. En otras fibras persistió aún la desintegración, como puede observarse por la disrupción de los bordes de las fibras y por las bandas de diaformeazan, en una configuración paralela alrededor de la fibra. Estos cambios fueron observados en los dos grupos. (Figura 16a, b).

A la semana 16 las fibras mostraron signos de regeneración; cambios regenerativos de las fibras tipo II, que fueron mayores en el grupo vascularizado. Los depósitos de diaformeazan tenían la apariencia de puntos, con altas concentraciones en el centro de la fibra muscular, cerca de la superficie muscular en la región del subsarcolema, los depósitos se concentraron en forma de láminas. Algunas fibras regeneradas tenían un halo central característico de la regeneración o una elevada concentración de diaformeazan en el centro de la fibra muscular. (Figura 17a, b).

Las fibras tipo II tienen un diámetro mayor que las fibras tipo I; el patrón de estas fibras se preservó en mayor proporción en los tubos vascularizados.

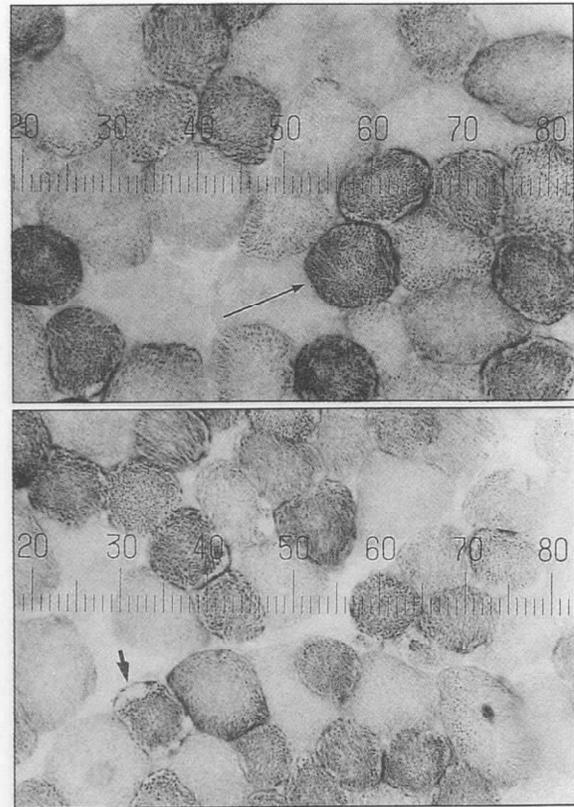


Fig. 16a y Fig. 16b. Degeneración de las fibras musculares. Depósitos de diaformeazán. (A vascularizado).

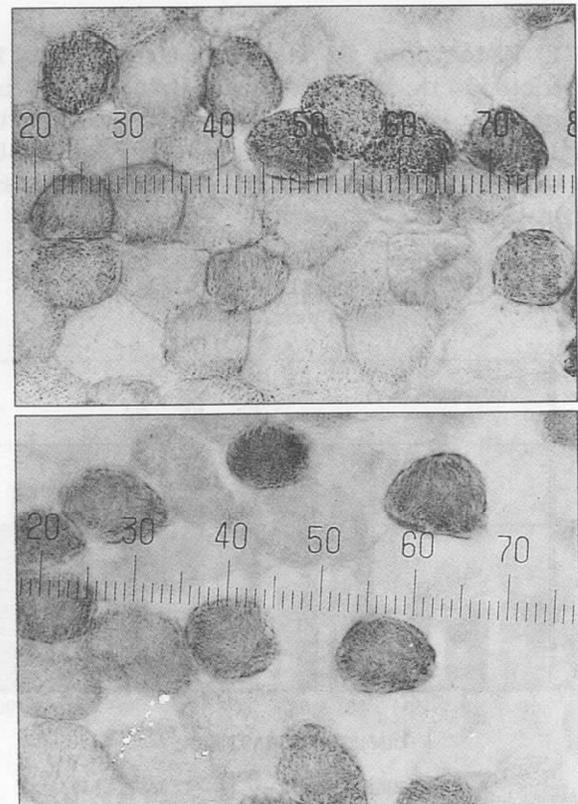


Fig. 17a y 17b. Regeneración de las fibras musculares. Concentración de diaformeazán en el centro de la fibra.

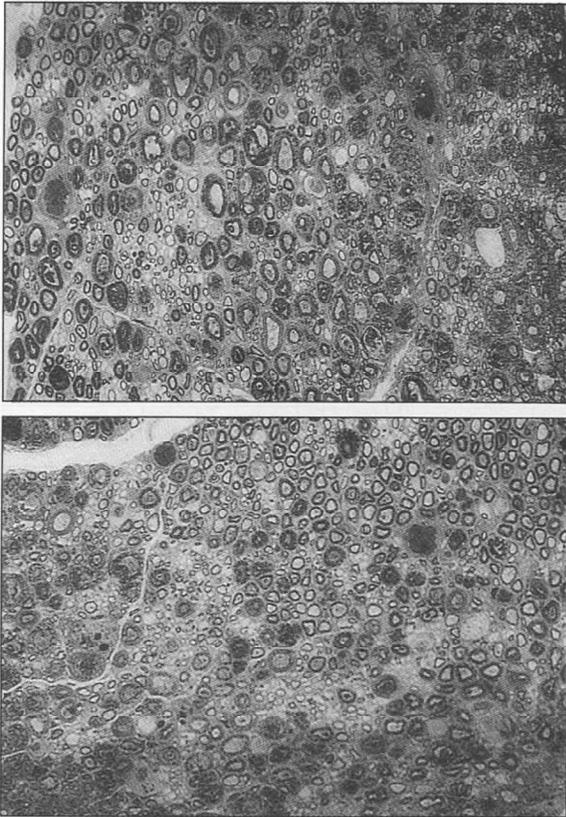


Fig. 12a, Fig. 12b. Puede observarse que la regeneración de la mielina es similar en los dos grupos.

El histograma de la Figura 13, muestra la distribución de las frecuencias absolutas de los diámetros de las fibras seccionadas en la parte media, expresados en micrones cuadrados. Esta distribución presenta los avances detectados en el proceso de regeneración.

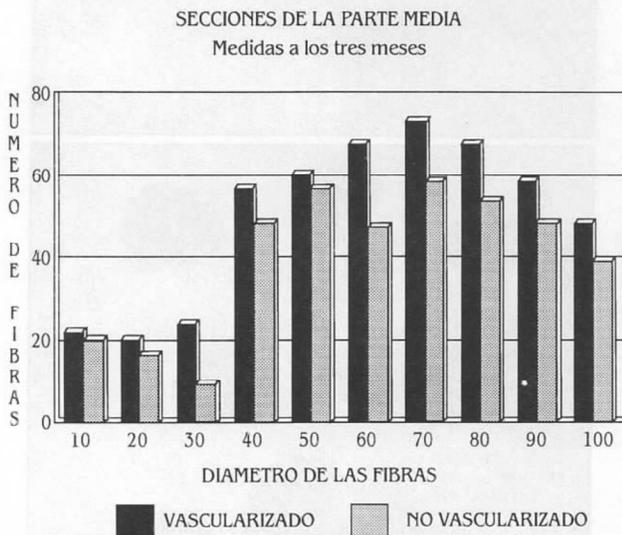


Fig. 13 Compara el número de fibras por mm² y el diámetro de las fibras.

Las figuras 14 y 15 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.

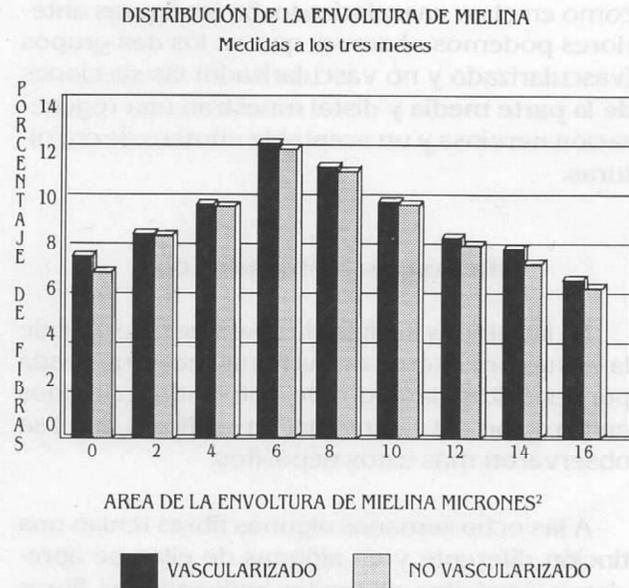


Fig. 14 Parte media

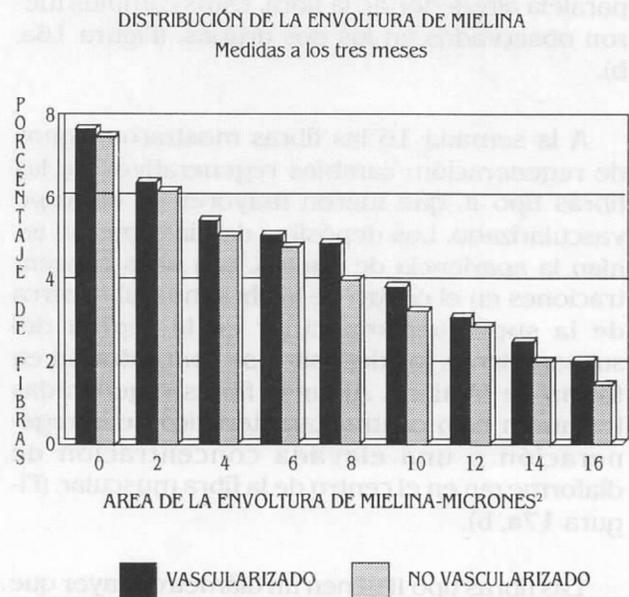


Fig. 15 Compara el número de fibras por mm² y el diámetro de las fibras.

El porcentaje de valores relativos para las fibras con un diámetro superior a 7 micrones, fue de 68.26%. 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 tubo perineural vacío vascularizado como en el no vascularizado. En las figuras anteriores podemos observar que en los dos grupos (vascularizado y no vascularizado) las secciones de la parte media y distal muestran una regeneración nerviosa y un aceptable número de envolturas.

Hallazgos histoquímicos

En las etapas iniciales la apariencia normal de la estructura interna de las fibras fue remplazada por depósitos alargados de diaformeazán situados en la región del sarcolema. En las fibras tipo I se observaron más estos depósitos.

A las ocho semanas algunas fibras tenían una tinción diferente y en algunas de ellas, se apreciaron depósitos alargados rodeando las fibras diferentes a las existentes en el músculo normal, las cuales no contienen el tipo de depósitos descritos anteriormente. En otras fibras persistió aún la desintegración, como puede observarse por la disrupción de los bordes de las fibras y por las bandas de diaformeazán, en una configuración paralela alrededor de la fibra. Estos cambios fueron observados en los dos grupos. (Figura 16a, b).

A la semana 16 las fibras mostraron signos de regeneración; cambios regenerativos de las fibras tipo II, que fueron mayores en el grupo vascularizado. Los depósitos de diaformeazán tenían la apariencia de puntos, con altas concentraciones en el centro de la fibra muscular, cerca de la superficie muscular en la región del subsarcolema, los depósitos se concentraron en forma de láminas. Algunas fibras regeneradas tenían un halo central característico de la regeneración o una elevada concentración de diaformeazán en el centro de la fibra muscular. (Figura 17a, b).

Las fibras tipo II tienen un diámetro mayor que las fibras tipo I; el patrón de estas fibras se preservó en mayor proporción en los tubos vascularizados.

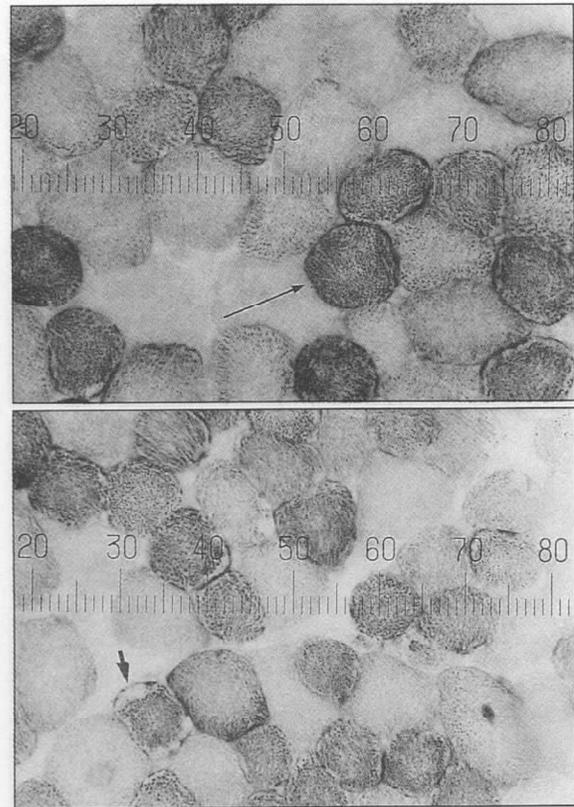


Fig. 16a y Fig. 16b. Degeneración de las fibras musculares. Depósitos de diaformeazán. (A vascularizado).

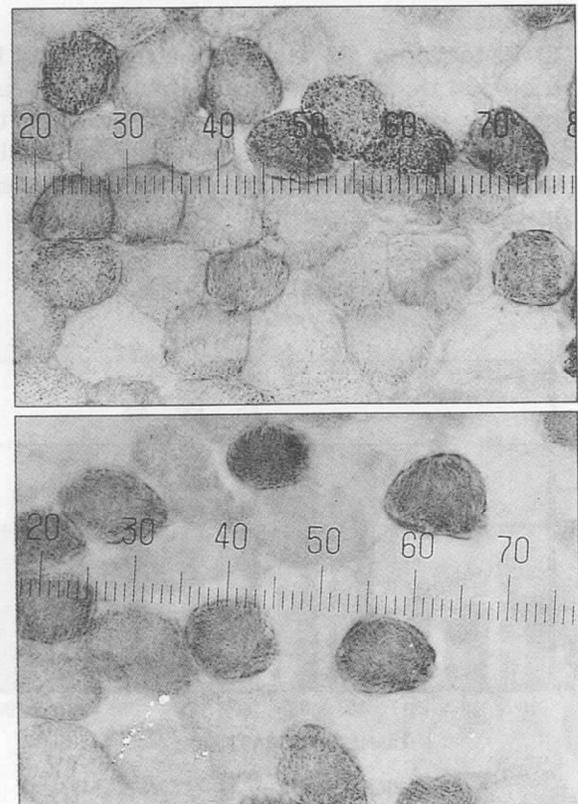


Fig. 17a y 17b. Regeneración de las fibras musculares. Concentración de diaformeazán en el centro de la fibra.