



11236
UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO

T-34

HOSPITAL JUÁREZ DE MÉXICO
SERVICIO DE OTORRINOLARINGOLOGÍA

**“Estudio histopatológico de la regeneración de nervio periférico
en animales de experimentación.”**

TESIS

Para obtener el título de:
Cirujano Otorrinolaringólogo

Presenta
Dra. Verónica Vázquez Ballesteros

Jefe de servicio y asesor principal
Dr. Guillermo Hernández Valencia

Asesor asociado
Dra. María Evelyn Cortés Gutiérrez

Colaboradores
Dr. Juan Carlos Valerio Rojas
M.V.Z. Dr. Carlos Gutiérrez Olvera



Septiembre 2003

1

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

Hospital Juárez de México



Estudio histopatológico de la regeneración de nervio periférico en animales de experimentación.

Dra. Verónica Vázquez Ballesteros

Residente de 4to. Año Otorrinolaringología

Dr. Guillermo Hernández Valencia

Jefe de Servicio Otorrinolaringología
Asesor Principal

Dra. María Evelyn Cortés Gutiérrez

Jefa de Servicio de Anatomía Patológica
Asesor asociado

Dr. Juan Carlos Valerio Rojas

Residente de 2do. Año Anatomía Patológica
Colaborador

M.V.Z. Dr. Carlos Gutiérrez Olvera

Encargado del Bioterio de la Unidad de Investigación Quirúrgica
Colaborador

* **Téc. Francisco Jiménez Gómez** *

Encargado de la Unidad de Investigación Quirúrgica
Colaborador

2

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Hoja de aprobación



A handwritten signature in black ink, appearing to read "Jorge Alberto Del Castillo Medina".

SECRETARÍA DE SALUD
HOSPITAL JUÁREZ DE MÉXICO
DIVISIÓN DE ENSEÑANZA

Dr. Jorge Alberto Del Castillo Medina
Jefe de División de Enseñanza

A handwritten signature in black ink, appearing to read "Guillermo Hernández Valencia".

Dr. Guillermo Hernández Valencia
Jefe de Servicio de Otorrinolaringología
Asesor Principal

A handwritten signature in black ink, appearing to read "María Evelyn Cortés Gutiérrez".

Dra. María Evelyn Cortés Gutiérrez
Jefa de Servicio de Anatomía Patológica
Asesor asociado

3

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Indice

Introducción	2
Antecedentes	2
Marco conceptual	4
Desarrollo de los elementos de los nervios periféricos	5
Sistema nervioso periférico	6
Regeneración de nervio periférico	6
Fibras nerviosas	6
La rata como animal de experimentación	7
Variedades disponibles	7
Longevidad	8
Características anatómicas y fisiológicas	8
Sistema nervioso periférico de la rata	8
Delimitación e identificación del problema	9
Objetivo general	9
Diseño del estudio (estructura y estrategia)	9
Material y métodos	9
Procedimiento	12
Estudio histológico	20
Resultados	20
Conclusiones	29
Bibliografía	30
Anexos	31

Introducción

La sección neural completa con una amplia separación entre los segmentos interrumpe completamente la continuidad endoneural y el aporte sanguíneo produciendo una mayor degeneración waleriana en los extremos proximal y distal. En esta situación la regeneración nerviosa requiere de una reconstrucción completa de los componentes del tronco nervioso. Después del daño, muchos factores determinan el proceso de regeneración. El medioambiente inmediato a nivel neural juega un papel muy importante. La regeneración neural depende en forma inmediata de los componentes celulares (células de Schwann, fibroblastos perineurales, etc.), componentes de la matriz extracelular (laminina, colágena tipo IV, moléculas adhesivas neurales, etc.), y factores neurotróficos (NGF, etc.), los cuales son producto de la denervación.

Clinicamente se han realizado múltiples estrategias para corregir defectos producidos por degeneración de nervios periféricos. La anastomosis neural primaria ha sido el mejor método de reparación; los defectos nerviosos amplios son reparados con injertos autólogos los cuales tienen diversas desventajas como producir parestesia y anestesia del sitio donador, heridas separadas, un diámetro semejante del injerto que es difícil de obtener, dejar un nervio seccionado, y dos sitios de sutura en la anastomosis. Además de la presencia de movimientos anormales involuntarios llamados sincinecias.^{1,11} La formación de cicatrices en el sitio de la lesión, es un importante factor para la regeneración nerviosa, por lo que es de utilidad determinar en cuanto tiempo se lleva a cabo esta cicatrización para realizar en el mejor momento posible la anastomosis nerviosa o la colocación de un injerto nervioso.⁸ Se ha visto la utilidad de diversos materiales que ayudan a la regeneración nerviosa como colgajos de vena, silastic, colocación de factor de crecimiento, entre otros pero nunca se ha establecido en que tiempo el nervio después de ser seccionado por traumatismo o por iatrogenia ofrece el mejor momento de regeneración en base a hallazgos histológicos para poder llevar a cabo una anastomosis termino-terminal o un injerto nervioso esperando el mayor éxito posible y el menor número de secuelas, lo cual es el objetivo de nuestro estudio.

Antecedentes

Importantes avances en microcirugía han provisto a los cirujanos de técnicas para la reparación de nervios periféricos dañados. Los tratamientos utilizados en la reparación de daño severo de los nervios periféricos requieren de un acomodo quirúrgico adecuado de los fascículos nerviosos en forma individual (neurorrafia primaria) o el uso de injertos autólogos nerviosos para los defectos mayores. El proceso de regeneración sin embargo puede ser variable y la recuperación funcional nunca es completa. El uso de injertos nerviosos resulta en morbilidad del sitio donador. El desarrollo de muchas técnicas para la reparación nerviosa se ve ahora limitado por los trabajos realizados para detallar la biología y química de la regeneración nerviosa. Recientes descubrimientos en las neurociencias,

combinadas con otros avances en el cultivo de células nerviosas, técnicas genéticas, y el desarrollo de biomateriales, proveen de optimismo para el tratamiento quirúrgico de las lesiones de nervios periféricos.³

Los orígenes de la reparación nerviosa datan de 1608, pero no fue sino hasta el siglo XIX, que los científicos enfocaron sus esfuerzos en dicho campo. Desafortunadamente los esfuerzos por reparar los nervios periféricos fueron pobres en cuanto a la recuperación funcional. Varios materiales fueron empleados en un intento por reparar los nervios dañados, incluyendo grasa, cartilago, hueso y tubos de metal. Los injertos de nervios autólogos fueron reportados por primera vez en ese tiempo. Durante la segunda Guerra mundial se obtuvo información adicional y estadística sobre los métodos de reparación nerviosa, sin embargo estos procedimientos no se completaron en cuanto a la restauración de la función. Esto no fue útil hasta los años 60's en que Millesi desarrolló técnicas microquirúrgicas en donde los fascículos nerviosos se afrontaban en forma precisa, lográndose una regeneración importante. Estos abordajes libres de tensión para la neurografía y el uso de injertos nerviosos autólogos mejoraron la funcionalidad y revolucionaron las técnicas en restauración nerviosa.^{3,9}

Después de algún tiempo en que la reparación nerviosa se hizo más común, se fueron buscando los requerimientos biológicos esenciales para su regeneración. El biólogo español Ramón y Cajal postulo sobre los agentes químicos que desde el muñón del nervio distal intervienen en la regeneración atrayendo a los axones proximales. Esta idea del Neurotrofismo fue discutida años después en una serie de experimentos por Weiss y colaboradores usando arterias como conductores, y manifestando que la regeneración nerviosa debía guiarse a través de medios físicos a su ultimo destino, sugiriendo que el contacto guiado era más importante que el neurotrofismo; sin embargo las limitaciones en el análisis ultraestructural no permitieron reafirmar estas interpretaciones sino hasta 1980 con los experimentos más sofisticados, los cuales demostraron que ambos (el neurotrofismo y el contacto guiado) son importantes en la regeneración nerviosa. Basados en esos resultados los cirujanos y científicos trabajan actualmente en las alternativas y nuevos métodos para la reparación de los defectos de nervios periféricos. Los injertos nerviosos autólogos son considerados como el "estándar de oro" para la reparación nerviosa amplia. Desafortunadamente la remoción de un nervio viable del sitio donador no es lo ideal, y la recuperación funcional nunca es completa.³

La adecuada reparación de los nervios dañados depende, en parte, de los factores locales que estén presentes en el sitio del trauma. La experiencia clínica durante las guerras del siglo pasado ha demostrado que en lesiones extensas con heridas contaminadas, la reparación neural tardía de 2 a 4 semanas produce una mejor recuperación. Sin embargo la sección neural incompleta (por contusiones, compresión o avulsiones parciales) o lesiones en compresión continua con daño del más de 60%, tanto clínica como con parámetros electrofisiológicos no ha podido ser realmente diferenciada de la sección neural completa.⁴

En la década pasada Viterbo y colaboradores fueron los pioneros de la técnica de reparación nerviosa término-terminal, e introdujeron una técnica nueva implantando un nervio seccionado, lateralmente dentro de un nervio sano y después removerlo con el epineuro., pero posteriormente se publicó que los resultados eran similares con remoción o sin remoción del epineuro.⁶

Marco conceptual

Regeneración: Crecimiento de múltiples yemas a partir del extremo distal del axón.¹⁴

Degeneración Walleriana: Degeneración del axón en forma retrógrada en su cabo proximal hasta alcanzar el primer nodo de Ranvier.¹⁴

Degeneración axonal: Cuando la disfunción de la neurona impide mantener su propio axón, comienza en el extremo terminal periférico del axón y evoluciona retrógradamente hacia el cuerpo neuronal.¹⁴

Desmielinización segmentaria. Pérdida selectiva de internodos mielínicos individuales con preservación del axón.¹⁴

Nervio: Asociación o fascículos de fibras nerviosas que se disponen paralelamente en el mismo sentido.¹⁵

Epineuro: Tejido conectivo moderadamente denso que rodea los fascículos nerviosos.^{13,14}

Perineuro: Consiste en capas concéntricas de células aplanadas separadas por capas de colágena . El número de capas varía de nervio a nervio y dependen del tamaño del fascículo nervioso.^{13,14}

Endoneuro: Compartimiento que contiene los axones, rodeados por células de Schwann, fibras de colágena, fibroblastos y capilares.^{13,14}

Factor de crecimiento nervioso(NGF): Es una larga proteína que consiste en tres subunidades y la unidad beta es la forma activa. Esta juega un importante papel en la diferenciación, mantenimiento y sobrevivencia de las neuronas sensitivas y simpáticas durante el desarrollo y la madurez.⁵

Vasa Nervorum: Se le llama así al conjunto de arteriolas y capilares que dan su irrigación al sistema nervioso y forman un plexo constituyendo la barrera hemato-nerviosa.

Células de Schwann: Vaina de células dentro de las fibras nerviosas. Son derivadas de la cresta neural y migran con el crecimiento axonal dentro del desarrollo de los nervios periféricos. Producen el factor de crecimiento nervioso tanto en el desarrollo como en la regeneración.

Bioterío: Area de apoyo básico, especializado en la producción y mantenimiento de diversas especies de animales de laboratorio. (Figura 2)

Desarrollo de los elementos de los nervios periféricos

La primera evidencia anatómica de la diferenciación del sistema nervioso (SN) es la placa neural, con el desarrollo de esta delgada y especializada área en la parte del ectodermo dorsal de la gástrula del desarrollo embrionario.

La cresta neural da origen a una variedad de tipos celulares. En el sistema nervioso periférico la cresta neural es el origen de las neuronas y células satélite de los ganglios autónomo y sensitivo, la placoda ectodérmica puede originar algunas células ganglionares en la región craneal. Las células de Schwann son derivadas de la cresta neural. Estas células tienen una gran propensión a proliferar y migrar antes de su diferenciación. Las células perineurales derivan de células de la cresta neural. Las motoneuronas se originan de células en el piso del cordón medular y crecen a través de mitosis. Las neuronas sensitivas y sus cuerpos celulares están en los ganglios espinales y son formados de células de la cresta neural.² Hay evidencias que sugieren que estas células que migran de la cresta neural son pluripotenciales, y su desarrollo subsecuente es determinado y limitado progresivamente por factores ambientales y por su relación con otros tipos celulares.

En 1909, Santiago Ramón y Cajal propuso el concepto de "sustancias neurotróficas" para explicar la especificidad y direccionalidad del crecimiento axonal en el desarrollo del sistema nervioso. Pero fue hasta 1960 en que el factor de crecimiento nervioso (NGF) fue descubierto por Rita Levi-Montalini y Stanley Cohen, como un factor neurotrófico derivado que soporta la supervivencia y diferenciación de los ganglios autónomo y sensitivo en el sistema nervioso periférico.

El NGF es una proteína compuesta por tres subunidades (alfa, beta y gamma), pero solo la Beta tiene actividad para promover el crecimiento nervioso. La matriz extracelular juega un importante papel en el crecimiento axonal. La punta de crecimiento axonal tiene receptores de adhesión para sustancias extracelulares como colágeno, fibronectina, laminina y entactina..

Sistema nervioso periférico

El sistema nervioso periférico (SNP) está formado por los componentes motor y sensitivo de los nervios craneales y medulares, el sistema nervioso autónomo con sus divisiones simpática y parasimpática, y los ganglios periféricos. Constituye el vehículo para que la información sensitiva llegue al sistema nervioso central (SNC), y para que las señales efectoras lleguen a los órganos periféricos terminales como el músculo esquelético.

Los nervios periféricos están formados por grupos de fascículos entremezclados. Cada fascículo está formado por un haz de axones individuales situados sobre tejido conectivo laxo en el que existen fibroblastos y colágeno (endoneuro) y que aparece revestido por una membrana de varias capas de células aplanadas (perineuro). Cada tronco nervioso está formado por un número variable de fascículos (hasta 50 en los nervios de mayor tamaño, como el ciático) que se mantienen unidos mediante tejido fibroso (epineuro).

Las principales arterias que irrigan al nervio (*vaso nervorum*)¹³ discurren por el epineuro, y únicamente las arteriolas terminales y los capilares se sitúan en el interior de los fascículos. Los axones tienen un diámetro que oscila entre 0.5 y 1.5 μ , cuando son mayores de 2 μ m, presentan vainas de mielina producidas por células de Schwann, de forma que los axones de mayor diámetro presentan las vainas de mielina más gruesas. La mielina se dispone en segmentos separados por nodos de Ranvier. La mielina de cada internodo está producida por una única célula de Schwann, a diferencia de los múltiples internodos de mielina que producen los oligodendrocitos en el SNC.¹⁴

Regeneración de nervios periféricos

Se debe al crecimiento de múltiples yemas a partir del extremo distal del axón. Cuando no se dificulta su crecimiento, los axones regenerados crecen retrógradamente hasta alcanzar el tronco nervioso de origen, a una velocidad aproximada de 1mm al día, en asociación de las células de Schwann que permanecen tras la digestión del axón degenerado y su mielina. En los casos en los que, como es frecuente en la degeneración waleriana, existe una lesión traumática del nervio con interrupción de su arquitectura fascicular, la interposición del hematoma o de la cicatriz fibrosa puede impedir que las yemas de regeneración axonal alcancen el extremo distal del nervio. Los axones regenerados obstruidos forman entonces una masa dolorosa de axones entremezclados que se denomina *neuroma traumática o de amputación*.

Fibras nerviosas

Los nervios periféricos contienen fibras nerviosas mixtas, mielínicas y amielínicas. Las fibras nerviosas periféricas son clasificadas en clase A, B y C de acuerdo a su tamaño, función y velocidad de conducción de los impulsos nerviosos.

La rata como animal de experimentación

Las variedades doméstica y albina de la rata gris, o noruega (*Rattus norvegicus*) (Tabla 1), originaria del Viejo Mundo, es quizá la especie más frecuentemente empleada en la investigación biomédica; frecuencia de empleo que se justifica teniendo en cuenta el volumen de información existente acerca de ella, su poco costo de mantenimiento, facilidad de manejo, relativa rusticidad e indicación para una amplia gama de procesos experimentales. (Figura 1)

Tabla 1.

TAXONOMIA:	
Clase	Mamífera
Orden:	Rodentia
Familia	Muridae
Género:	Rattus
Especie	norvegicus

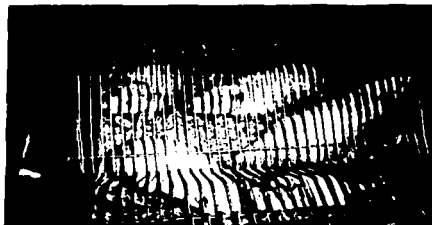


Figura 1. Ratas de laboratorio tipo Wistar

Rattus norvegicus comenzó a ser producida por los naturalistas del siglo XIX, llegando ya, alrededor de 1900 a ser la especie más empleada en la investigación clínica y etológica.

Variedades disponibles

Al igual que en el caso de los ratones, existen distintos tipos de ratas, clasificables en función de sus características ecológicas (libres de gérmenes, genotóxicas y convencionales) y genéticas. Entre las estirpes más empleadas cabría citar la Sprague-Dawley, la Wistar y la Long-Evans. (Figura 1) La variedad Sprague-Dawley, de capa blanca, tiene la cabeza más fina y la cola más larga que las otras variedades. Es sumamente prolífica, pero en cambio, es también más susceptible a las alteraciones respiratorias que la variedad Wistar. Esta última, que tiene así mismo la capa blanca, posee una cabeza gruesa, cola más corta que el cuerpo, orejas largas y una resistencia a algunas enfermedades infecciosas superior a la de otras variedades. Por el contrario sus camadas suelen ser más reducidas. Finalmente, la variedad Long-Evans, de capa blanca, con la cabeza, cuello y hombros negros, tiene un formato más reducido que las anteriores. Por todo lo descrito anteriormente decidimos emplear la variedad Wistar para nuestro protocolo de estudio.¹²



Figura 2. Bioherbario del Hospital Juárez de México.

Longevidad

Normalmente estos animales viven por encima de los 3 años, si bien su vida reproductiva útil no rebasa los 14 meses, lapso durante el cual, sin embargo, llegan a producir entre 6 y 10 camadas, integrada cada una de ellas por 6 a 12 crías. La gestación dura de 20 a 22 días.¹²

Características anatómicas y fisiológicas

Salvo por el hecho de carecer de vesícula biliar, quizás la característica más importante de la rata sea, precisamente, carecer de ella. Y de hecho el poseer una anatomía y fisiología no especializadas, en su tamaño, su comportamiento bien definido, necesidades nutritivas convencionales y escasa respuesta a los agentes patógenos, hacen de la rata el sujeto ideal para la investigación biomédica. Normalmente se emplea para investigaciones biológicas sobre factores nutricionales y endocrinológicos, estudios toxicológicos, investigaciones en torno al cáncer, inmunología y radiación.¹²

Sistema nervioso periférico de la rata

La rata es un mamífero y como tal tiene un sistema nervioso central y un sistema nervioso periférico. Este último está compuesto por 34 pares de nervios espinales, 8 cervicales, 13 torácicos, 6 lumbares, 4 sacros, y 3 caudales. Estos pares de nervios espinales emergen desde el cordón espinal a través de los forámenes intervertebrales

Delimitación e identificación del problema

El problema por investigar es determinar el tiempo óptimo para llevar a cabo un injerto nervioso o una anastomosis termino-terminal posterior a haber seccionado un nervio periférico y observar las fases de la regeneración en estos para determinar el momento en que un injerto tendría mayor éxito.

Objetivo General

El objetivo de este estudio es determinar el tiempo ideal en que un nervio periférico posterior a haber sido seccionado cursa con la mayor capacidad de regeneración a nivel histológico y de acuerdo a esto decidir en que momento debe llevarse a cabo una anastomosis neural primaria o colocar un injerto nervioso esperando un mejor resultado.

Diseño del estudio (Estructura y estrategia)

Estudio longitudinal, prospectivo, experimental, biomédico, clínico, original y replicativo.

Material y Métodos

Se utilizaron 20 ratas Wistar machos de 7 meses de edad con peso entre 410 y 600gr. (media de 506gr) las cuales se dividieron en 4 grupos de 5 ratas cada uno en forma aleatoria.

Tomando en cuenta las buenas prácticas de laboratorio y las normas internacionales para el uso de animales de experimentación se llevó a cabo el siguiente estudio experimental. (Anexo 1)

Se aplicó anestesia a base de Tiopental sódico (Figura 4) a dosis de 12.5mg/Kg. por vía intraperitoneal, sin requerir premedicación, se colocaron bajo efecto anestésico en una base de madera con sujeción de las cuatro extremidades, se rasuró zona quirúrgica y bajo visión microscópica (microscopio marca Zeiss K 120/76 con lente de 200x y cámara Sony CCD/RGB) con el material necesario para microcirugía (Figura 3) se realizó abordaje en miembro inferior izquierdo en región glútea, (Figura 8) realizando incisión longitudinal siguiendo el trayecto de los haces musculares con disección roma (Figura 10) se llegó hasta región de nervio ciático (Figura 11) buscando su porción más proximal se seccionó el nervio completamente y se tomó filete nervioso de aproximadamente 3mm. (Figura 13) Dejando los cabos proximal y distal libres se afrontó piel con sutura Nylon 7-0 y puntos simples. Se aplicó antiséptico y cicatrizante tópico a base de ácido tánico, alcanfor, violeta de genciana y agua bidestilada (Zircatrin); sin requerir posteriormente medicación solo vigilancia de la herida quirúrgica. (Figura 17).

El grupo #1 se reintervino a los 5 días y se seccionó nuevamente tanto el cabo distal como el proximal tomando filete nervioso de aproximadamente 3mm de longitud de ambos cabos y se enviaron las muestras a estudio histopatológico. (Figura 18 y 19).

El grupo #2 se interviene de la misma forma a los 10 días, el grupo #3 a los 15 días y el grupo #4 a los 20 días, (Figura 20 y 21) enviando todas las muestras a estudio histopatológico donde fueron incluidas y teñidas con hematoxilina-eosina y analizadas en microscopio Zeiss Axiostar Plus con implemento para fotografía a 5x, 10x y 40x, con cámara fotográfica Sony Cyber Shot 3.3 Mega Pixeles, modelo Dsc -S75 con lente Zeiss.

Este trabajo se realizó en el bioterio y clínica de cirugía experimental del Hospital Juárez de México y las muestras fueron analizadas en el servicio de Anatomía Patológica de la misma institución. (Figura 5)

Los animales se sacrificaron de acuerdo al grupo; a los 5 días el grupo 1, a los 10 días el grupo 2, a los 15 días el grupo 3 y a los 20 días el grupo 4 utilizando xilocaína intracardiaca previa sedación del espécimen con Tiopental.

La única complicación encontrada fue la muerte de tres especímenes por hipotermia el mismo día de la intervención, los cuales fueron remplazados pero volvió a ocurrir la muerte de otro espécimen por lo que la muestra final fue de 19 ratas solamente en lugar de 20.

Muestra de ratas N=20

Grupo (N=5 ratas)	Muertes por hipotermia posanestésica	Reemplazos
1	0	0
2	2	2
3	1	0
4	0	0

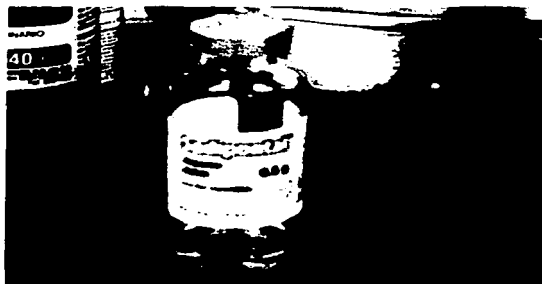
Muestra de ratas N=19

Grupo (N=5 ratas)	Día de sección nerviosa	Toma de Muestra de 3mm de Cabo proximal	Toma de muestra de 3mm de Cabo distal	Estudio histopatológico
1	5º. Día	Si	Si	Si
2	10º. Día	Si	Si	Si
3 (solo 4 ratas)	15º. Día	Si	Si	Si, solo a 4
4	20º. Día	Si	Si	Si

Se utilizó material quirúrgico especial para microcirugía y anestésico de tipo Tiopental, sin requerir premedicación del espécimen .



Figura 3. Material utilizado para microcirugía.



**Figura 4. Anestésico utilizado en el estudio.
Sodipental (Tiopental)**



Figura 5. Quirófano de investigación Hospital Juárez de México.

Procedimiento

La intervención quirúrgica se realizó bajo visión microscópica para lo cual fue proporcionado un microscopio marca Zeiss K 120/76 con lente de 200x y cámara Sony CCD/RGB. (Figura 6). No se requirió de vestimenta quirúrgica ni técnica aséptica ya que el tipo de animales de experimentación utilizados muy rara vez presentan infecciones posquirúrgicas. Se aplicó anestesia local a base de xilocaína al 2% + Epinefrina en una dilución de 1/100,000.



Figura 6. Microscopio marca Zeiss K 120/76 con lente de 200x y cámara Sony CCD/RGB.

Se rasuró región glútea izquierda en todos los especímenes, y se realizó incisión longitudinal siguiendo los haces musculares para no dañar las fibras de estos últimos y evitar complicaciones e inmovilidad de la extremidad.



Figura 7. Preparación y fijación del espécimen.



Figura 8. Región glútea izquierda preparada para el procedimiento quirúrgico.



Figura 9. Procedimiento quirúrgico.



Figura 10. Incisión en región glútea izquierda, longitudinal siguiendo el trayecto de los haces musculares.

Se continúa disección roma separando los haces musculares hasta llegar al hueso de la región glútea visualizando el nervio ciático que atraviesa esta región, se disecciona a su alrededor hasta separarlo de las fibras musculares.



Figura 11. Abordaje con técnica roma siguiendo la disposición de los haces musculares hasta visualizar nervio ciático antes de su bifurcación.



Figura 12. Fotografía de nervio ciático donde podemos observar su irrigación

Posteriormente se coloca abatelenguas de madera por debajo del nervio y se secciona con navaja en forma transversal en su polo más proximal para evitar el mayor dolor posible al animal.



Figura 13. Sección transversal nerviosa con navaja, primero se secciona el cabo proximal.

Se secciona también el cabo distal cortando filete nervioso de aproximadamente 3mm el cual se incluye en formol al 10% para ser transportado al servicio de Anatomía patológica para su estudio, esto se realiza en los 20 especímenes el mismo día, identificando los grupos del 1 al 4 con números para posteriormente reintervenirlos a los 5, 10, 15, y 20 días respectivamente.



Figura 14. Posteriormente se secciona el cabo distal obteniendo muestra de aproximadamente 3mm de longitud.

Se dejan ambos cabos libres, y se sutura herida de piel con Nylon 7-0 y puntos simples, aplicando en piel cicatrizante y antiséptico a base de ácido tánico, alcanfor, violeta de genciana y agua bidestilada (Zircatrin); y no se da antibiótico posquirúrgico ya que estos animales tienen un muy bajo índice de infecciones posquirúrgicas.



Figura 15. Se observa nervio ya seccionado en su totalidad y se dejan ambos cabos libres.



Figura 16. Nervio seccionado observamos cabo proximal y distal.



Figura 17. Especímenes en el postoperatorio mediato con aplicación en la herida de cicatrizante y antibiótico.



Figura 18. Reoperación a los 5, 10, 15 y 20 días

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

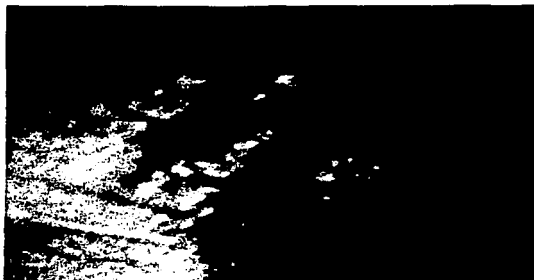


Figura 19. Exposición de la región quirúrgica cicatrizada a los 10 días de la cirugía



Figura 20. Se observan cabos nerviosos envueltos en tejido y músculo 10 días después de la primera intervención.

Estudio histológico

Se utilizó un microscopio Zeiss Axiostar Plus con implemento para fotografía a 5x, 10x y 40x, con cámara fotográfica Sony Cyber Shot 3.3 Mega Píxeles, modelo Dsc -S75 con lente Zeiss. Todas las laminillas fueron preparadas con tinción clásica de hematoxilina y eosina.

En la primera muestra se revisaron los 20 fragmentos tomados del nervio sin lesión para descartar patología agregada en alguno de los especímenes, en las muestras subsecuentes a los 5,10,15 y 20 días se analizaron los fragmentos tomados tanto del cabo distal como proximal de todos los grupos con los siguientes resultados.

Resultados

Se realizó resección nerviosa al total de la muestra obteniendo fragmento de nervio ciático de cada uno de ellos y enviándolo a estudio histopatológico en donde reportaron: Fibras nerviosas de características histológicas normales y tejidos blandos, se identifica endoneuro, perineuro y fibras en fascículos longitudinales y transversales, además de vasos sanguíneos, células ganglionares e infiltrado inflamatorio de tipo agudo perivascular así como músculo de aspecto normal.

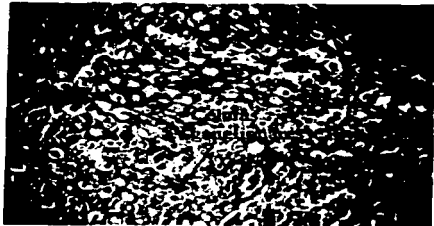
Microfotografías representativas de la primera toma de muestra de nervio sano

Figura 21. (Grupo 1-1)



Microfotografía 5x.
Se identifican fibras nerviosas histológicamente normales, además de tejidos blandos.

Figura 22. Grupo 2-5



Microfotografía 40x.
Se identifican células ganglionares de
aspecto normal

Figura 23. Grupo 3-4



Microfotografía 40x
Se identifica infiltrado inflamatorio de tipo
agudo, perivascular, resto de tejido
histológicamente normal.

Figura 24. Grupo 4-5



Microfotografía 10x
Se identifican fibras nerviosas
histológicamente de características
normales

Grupo 1 en el cual se realizó la reintervención a los 5 días tomando muestra tanto del cabo proximal como distal, reportando:

Proximal: Fibras nerviosas dispuestas en fascículos rodeadas por infiltrado inflamatorio de predominio agudo y en menor porcentaje crónico (agudo= Polimorfonucleares y Crónico= Linfocitos) además de tejido de granulación (vasos de neoformación y fibroblastos) se aprecian histiocitos (macrófagos).

Distal: Fibras nerviosas dispuestas en fascículos. Con abundante tejido inflamatorio agudo y crónico, así como vasos de neoformación y fibroblastos.

Figura 25. Grupo 1-1 Proximal



Microfotografía 40x.
Se identifica tejido nervioso con infiltrado
inflamatorio agudo y crónico, ectasia
vascular y tejido de granulación.

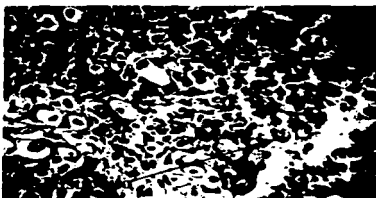
Figura 26. Grupo 1-1 Proximal



Microfotografía 40x

Se identifican fibras nerviosas dispuestas en fascículos rodeadas de infiltrado inflamatorio agudo y crónico. Además de tejido de granulación (vasos de neoformación y fibroblastos).

Figura 27. Grupo 1-2 Proximal



Microfotografía 10x.

En uno de los polos del nervio se identifica abundante infiltrado inflamatorio de tipo agudo y crónico con presencia de histiocitos (macrófagos) y fibroblastos, además de abundante material de granulación.

Figura 28. Grupo 1-2 Distal



Microfotografía 5x.

Se identifica nervio, sus fibras nerviosas dispuestas en fascículos, en uno de sus polos abundante tejido inflamatorio agudo y crónico además de abundante tejido de granulación, vasos de neoformación y fibroblastos.

Figura 29. Grupo 1-3 distal



Microfotografía 10x
Se identifica abundante infiltrado inflamatorio de tipo agudo y crónico, y tejido de granulación (vasos de neoformación y fibroblastos)

Figura 30. Grupo 1-4 distal.

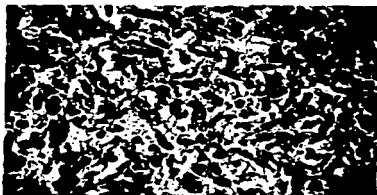


Microfotografía 5x.
Se identifica el nervio, con sus fibras dispuestas en fascículos y en uno de sus extremos se identifica infiltrado inflamatorio de tipo agudo y crónico además vasos de neoformación y reacción fibroblástica.

Grupo 2 . Se realizó la reintervención a los 10 días, tomando muestra también del cabo proximal y distal, reportando:

Proximal y distal: Datos de regeneración. Se identifican haces dispuestos en fascículos y entre estos infiltrado inflamatorio agudo y crónico más abundante, tejido de granulación extenso. Células propias del nervio que se entrelazan lo cual nos muestra migración de estas con datos de regeneración nerviosa.

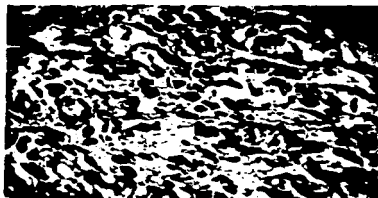
Figura 31. Grupo 2-1 Proximal



Microfotografía 40x

Se observa abundante infiltrado inflamatorio crónico y en menor cantidad agudo así como formación escasa de fibras de colágena.

Figura 32. Grupo 2-2 Proximal



Microfotografía 40x.

Se observan datos de regeneración (células con núcleos grandes y citoplasma escaso), fibras nerviosas entrecruzadas entre extenso infiltrado inflamatorio y vasos de neoformación.

Figura 33. Grupo 2-2 Distal



Microfotografía 10x.

Se observan vasos sanguíneos ectásicos.

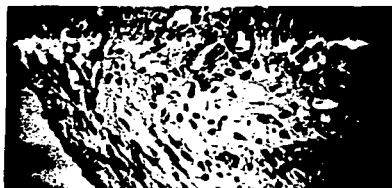
Figura 34. Grupo 2-5 proximal



Microfotografía 10x.

Se identifican haces dispuestos en fascículos y entre estos abundante infiltrado inflamatorio agudo y crónico, reacción inflamatoria intensa y vasos de neoformación.

Figura 35. Grupo 2-5 distal



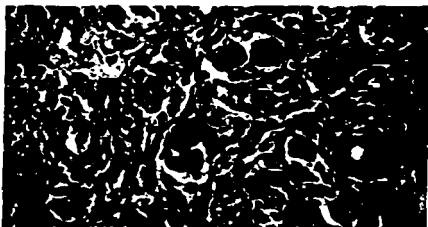
Microfotografía 5x.

Se observan datos de regeneración (células con núcleos grandes y citoplasma escaso), fibras nerviosas entrecruzadas entre extenso infiltrado inflamatorio y vasos de neoformación.

Grupo 3. Reintervenido a los 15 días, tomando muestra de cabo proximal y distal, reportando:

Proximal y distal: Datos de fibrosis. Nervio con fibras en fascículos. Infiltrado inflamatorio crónico en su mayoría, con muy poco infiltrado inflamatorio agudo (polimorfonucleares), haces nerviosos entrelazados con bandas de colágena. Tejido de granulación extenso con finas bandas de colágena.

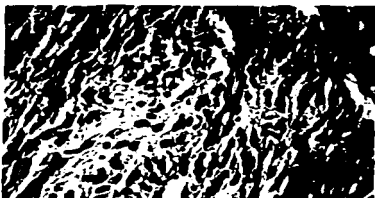
Figura 36. Grupo 3-4 Distal.



Microfotografía 40x.

Se observa infiltrado inflamatorio de tipo crónico, con gruesas fibras de colágena, histiocitos y reacción fibroblástica.

Figura 37. Grupo 3-4 Proximal



Microfotografía 40x.

Se observa infiltrado inflamatorio de tipo crónico, reacción fibroblástica y gruesas fibras de colágena.

Figura 38. Grupo 3-5 Proximal



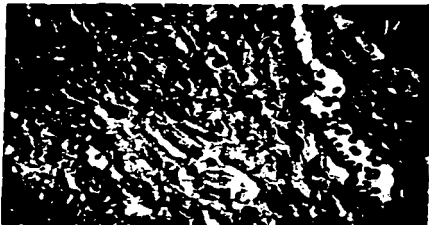
Microfotografía 10x.

Tanto el cabo proximal como distal se observan datos de fibrosis. Nervio con fibras en fascículos. Infiltrado inflamatorio crónico en su mayoría, con muy poco infiltrado inflamatorio agudo (polimorfonucleares), haces nerviosos entrelazados con bandas de colágena. Tejido de granulación extenso con finas bandas de colágena.

Grupo 4. Reintervenido a los 20 días, tomando muestra de cabo proximal y distal, reportando:

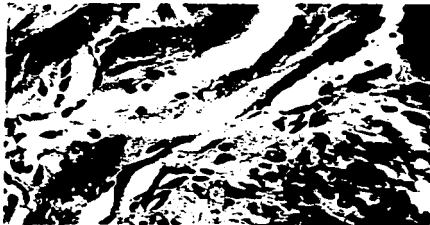
Proximal y distal: Tejido de granulación, con infiltrado inflamatorio crónico, gruesas fibras de colágena en el polo de sección nerviosa tanto proximal como distal.

Figura 39. Grupo 4-3 proximal



Microfotografía 10x.
Tejido de granulación, con infiltrado inflamatorio crónico, gruesas fibras de colágena en el polo de sección nerviosa tanto proximal como distal

Figura 40. Grupo 4-3 distal



Microfotografía 40x.
Se observan gruesas bandas de colágena, reacción fibroblástica e inflamatoria crónica.

Conclusiones

De acuerdo al estudio realizado podemos concluir que fue útil y significativo clínicamente para determinar el tiempo óptimo de regeneración nerviosa en nervio periférico y el mejor momento para llevar a cabo un injerto nervioso o una anastomosis termino-terminal de acuerdo a los cambios histológicos presentados en cada una de las muestras.

Se pudo observar que los días en que hubo una mayor regeneración fueron los 10 primeros posterior a la sección nerviosa, ya que en plazos mayores se observó que empezaron a existir datos de degeneración y fibrosis de ambos cabos, tanto proximal como distal sin obtener diferencias significativas entre estos dos últimos.

En cuanto a los cambios de regeneración nerviosa no se presentaron diferencias significativas en ambos cabos del nervio seccionado en ninguna de las etapas del estudio tal vez porque el riego sanguíneo continúa siendo el mismo, ya que no se interrumpe por la sección nerviosa y la irrigación no depende de un solo vaso sino, de un conjunto de arterias circundantes que proporcionan una red capilar en el endonuevo llamada barrera neuro-vascular.

Histológicamente se identificó como elemento de regeneración nerviosa la formación de fibras con células entrelazadas en donde las células de Schwann migran al sitio lesionado para tratar de regenerarlo, junto con otros elementos como la neoformación vascular y la presencia de células ganglionares.

El presente trabajo nos ayuda a determinar un tiempo en el cual debe actuarse en el paciente con trauma agudo o sección de nervio periférico, para tratar de que los resultados al llevar a cabo una anastomosis termino-terminal o un injerto nervioso sean óptimos con el mínimo de secuelas. El manejo de dichos tiempos en el campo de la otorrinolaringología es de mucha utilidad en las lesiones del nervio facial por traumatismos o accidentes quirúrgicos.

La importancia de la identificación del tiempo en que los extremos de sección del nervio degeneran, contribuye a disminuir la necesidad de seccionar los cabos nerviosos con una mayor extensión ocasionando un defecto más amplio que impediría la anastomosis termino-terminal y obligaría a tomar un injerto nervioso con todas las consecuencias que esto conlleva para nuestro paciente como la presencia de parestias en el sitio donador, la exposición a dos heridas quirúrgicas y menor éxito en cuanto a la recuperación funcional.

Se debe continuar realizando investigación en esta área con la finalidad de lograr una mayor precisión en el momento de la regeneración de nervios periféricos ya que el éxito funcional en este tipo de cirugías sigue siendo pobre y conlleva a que los pacientes continúen con secuelas importantes y deformantes que interfieren en su vida diaria y socialización.

Bibliografía

1. Gershon Spector, MD; Patty Lee, MD; et. al. Facial Nerve Regeneration Trough Autologous Nerve Grafts: A Clinical and Experimental Study. *Laryngoscope* No. 101; May 1991. pp: 537-554.
2. Peter J. Dyck, Phillip A. Low and Clarke Stevens. *Disease of Peripheral Nerves. Clinical Neurology*. Vol 4 Philadelphia, J.B. Lippincott, 1993. pp: 1-106.
3. Terry W. Hudson. *Engineering Strategies for Peripheral Nerve Repair*. Orthopedic Clinics of North America. Vol.31. No.3. July 2000.
4. Spector, J. Gershon MD, FACS; Lee, Patty MMd; Derby, Albert Ph.D. Rabbit Facial Nerve Regeneration in Autologous Nerve Grafts After Antecedent Injury. *Laryngoscope*. Vol. 110(4). April 2000. pp: 660-667.
5. Pu, Lee L. Q. M.D., Ph.D.; Syed, Shamsuddin A. M.D.; et.al. Effects of Nerve Growth Factor on Nerve Regeneration Through a Vein Graft across a Gap. *Plastic and Reconstructive Surgery*. Vol. 104 (5). October 1999. pp: 1379-1385.
6. Yüksel,Fuat M.D.; Karacao Lu, Ercan M.D.; Güler, M. Mümtaz M.D. Nerve Regeneration Through Side-to-Side Neuroorrhaphy Sites in a Rat Model: A New Concept in Peripheral Nerve Surgery. *Palastic and Reconstructive Surgery*. Vol. 104(7). December 1999. pp: 2092-2099.
7. Senoo, Eiji MD; Tamaki, Norihiko MD; Fujimoto, Etsuko PhD; Ide, Chizuka MD. Effects of Prelesioned Peripheral Nerve Graft on Nerve Regeneration in the Rat Spinal Cor. *Neurosurgery*. Vol 42(6). June 1998. pp: 1347-1356.
8. Meuli-Simmen, Claudia M.D.; Meuli, Martin M.D.; et al. Midgestational Sciatic Nerve Transsection in Fetal Sheep Results in Absent Nerve Regeneration and Neurogenic Muscle Atrophy. *Plastic and reconstructive Surgery*. Vol. 99(2). February 1997. pp: 486-492.
9. Newman, James P. MD; Verity, A. Neil PhD; et al. Ciliary Neurotrophic Factor Enhances Peripheral Nerve Regeneration. *Archives Otolaryngology Head and Neck Surgery*. Vol. 122(4). April 1996. pp: 399-403.
10. Widerberg, Annika, Kanje, Martin; Dahnlín, Lars B. Tourniquet compression: a non-invasive method to enhance nerve regeneration in nerve grafts. *Neuroreport*. Vol. 13(4). March 25, 2002. pp: 371-375.
11. A. Hazari, M. Wiberg, G. Johansson-Rudent, C. Green and G. Terenghi. A resorbable nerve conduit as an alternative to nerve autograft in nerv gap repair. *British Journal of Plastic Surgery*. Vol. 52. 1999. pp: 653-657.
12. Farris, E.J., and Griffiths, J.Q.: *The Rat in Laboratory Investigation*. New York, Hafner, 1962.
13. Stephen S. Sternberg. *Histology for Pathologists*. Second Edition. Lippincott Williams and Wilkins. China 1997. pp: 285-311.
14. Cotran Kumar Robbins. *Patología Estructural y Funcional*. 4ª. Edición. Vol. 2. Madrid España 1990. pp: 1518-1526.
15. *Diccionario de la lengua española y nombres propios*. Equipo Didáctico Océano. Grupo Océano. Vol. 3. pp: 530.
16. Green, E.C.: *Anatomy of the Rat*. New York, Hafner, 1935.
17. Charles W. McPherson. *Laws, Regulations, and Policies Affecting the Use of Laboratory Animals*. Chapter 2. *Laboratory Animal Medicine*. 1984. pp: 19-29.
18. Tena Betancourt E., *Guía de procedimientos adecuados de uso y cuidado en animales de laboratorio y bioterio*, 1ª. Edición, C.I.P.A.M. , Monográfica técnica 1994.

Anexo 1

Guía de procedimientos Adecuados de uso y cuidado de animales de laboratorio y bioterio:

1. Todo experimento que involucre el uso de animales vivos, deberá ser desarrollado, por o bajo la supervisión de un científico debidamente calificado.
2. En toda instancia donde sea requerido el uso de animales de laboratorio para control de calidad o investigación, éstos deberán ser mantenidos en tal forma que se asegure su confort físico y su bienestar psicológico.
3. Los animales de laboratorio no deberán ser sujetos al dolor o bien, a un sufrimiento realmente innecesario. El protocolo de investigación deberá salvaguardar dicha condición, sin importar la naturaleza de la prueba en investigación, enseñanza o control de calidad de medicamentos. Así mismo, el costo y la conveniencia, no deberán prevalecer por encima de la salud física o mental de los animales.
4. Se procurará la opinión experta para juzgar la validez potencial del uso de animales de laboratorio, en especial para justificar el desarrollo de algunos procedimientos o prácticas restringidas, como las mencionadas a continuación:
 - 4.1. Las lesiones por calor o congelación, fracturas y otros tipos de traumas causados a animales anestesiados, deberán ser desarrollados de acuerdo con las prácticas aceptables de anestesia y analgesia de la medicina veterinaria, para aliviar el dolor durante y posterior a dichos procedimientos.
 - 4.2. El encuentro y o el confinamiento de animales depredadores con sus presas, o bien de especies en donde fuera probable la ocurrencia de lesiones por peleas prolongadas.
5. Si el dolor o el sufrimiento son concomitantes necesarios párale estudio, éstos deberán ser reducidos tanto en su periodo de duración como en intensidad. Consecuentemente los investigadores y comités de uso y cuidados de animales, observarán una especial cautela al evaluar los propósitos y el valor real de realizar procedimientos como los siguientes:
 - 5.1. Experimentos que impidan la medicación analgésica de tipo pre y pos operatorio.
 - 5.2. Experimentos que provoquen una inmovilización o parálisis en el sujeto, sin la reducción de la sensación al dolor.
 - 5.3. Experimentos con reforzamientos negativos, en donde se utilicen electrochoques.
 - 5.4. Experimentos que involucren condiciones ambientales extremas como baja o alta temperatura, humedad relativa o cambios bruscos de éstas.
 - 5.5. Experimentos destinados al estudio del estrés y del dolor.
 - 5.6. Experimentos que requieran la privación de alimento y de agua durante periodos incompatibles con las necesidades fisiológicas particulares del animal; enfatizando que este tipo de estudios no deberán tener efectos que actúen en detrimento de la salud del sujeto.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

6. De observarse un animal sufriendo dolor severo intratable, éste deberá ser sacrificado humanitariamente mediante un método eutanásico que induzca una inconciencia inicial.
7. Experimentos capaces de inducir un dolor excesivo y que por lo tanto resultan inaceptables, incluyen los siguientes:
 - 7.1. El uso de drogas paralizantes o relajantes musculares (tipo curare y curareiformes), solas sin anestésicos durante procedimientos de orden quirúrgico.
 - 7.2. Aquellos procedimientos de trauma directo como lo son el aplastamiento, quemaduras, impactos o bien, golpes en animales sin anestesiarse.
8. En investigación de tipo toxicológico, cáncer y de enfermedades infecciosas en donde un estudio pudiese continuar hasta la muerte del animal se deberá aplicar el criterio de modificación de objetivos.
9. De observarse signos distintivos de sufrimiento o dolor irreversible. De esta manera pueden ser conciliados tanto los requerimientos del estudio así como las necesidades del animal.
10. La sujeción física prolongada de los animales únicamente debe ser considerada si todas las alternativas han sido agotadas. En todo evento los sujetos mantenidos bajo este régimen deben ser objeto de cuidados extraordinarios conforme los requieran las especies en estudio.
11. No se justifica el desarrollo de procedimientos dolorosos o invasivos de tipo múltiple, tan solo para efectos de enseñanza o bien para la comprobación de conocimiento científico ya establecido. En estos casos es muy recomendable recurrir al uso de métodos alternos audiovisuales para difundir esta información en forma preliminar tratando con ello de limitar un uso innecesario de animales de laboratorio.¹⁸

TFCS COM
FALLA DE ORIGEN