

ARTICULO ORIGINAL

Estudio de la regeneración de nervio periférico a través de cámaras permeables de silicona con poros de 10 y 60 micras

Luis H. Alzate¹, John J. Sutachán², Ewing Duque², Hernán Hurtado²

Resumen

Se entubó el nervio ciático de ratas, luego de un corte transversal, utilizando una cámara de silicona de 14 mm de largo que tenía dos ventanas de 8 mm de largo cubiertas con malla de 10 o 60 μm . Después de 6 meses, los animales se perfundieron con una mezcla de glutaraldehído y paraformaldehído, y se evaluó el aspecto microscópico de los nervios regenerados en dos niveles dentro de la cámara (3 mm y nivel medio) y 5 mm distal a ésta. Se contó el número de fibras mielínicas presentes en cada nivel y tratamiento, y se realizó una comparación entre ellos. Se encontró una importante desorganización del endoneurio a nivel medio de la cámara. Distalmente, los conteos de fibras mielínicas fueron muy bajos. No se observaron diferencias significativas entre los grupos con mallas de 10 y 60 μm . En conclusión, la presencia de poros de 10 o 60 μm no impide la entrada masiva de fibroblastos a la cámara, llevando a una marcada desorganización del nervio regenerado.

Palabras clave: regeneración, nervio periférico, entubación, fibroblasto, permeabilidad.

A study of peripheral nerve regeneration in permeable silicone chambers with 10 and 60 micrometer pores

Abstract

Rat sciatic nerves were transected and intubated with a fourteen millimeter length-silicone chamber, with two 8 mm windows covered with either a 10 or 60 μm mesh. After six months, the animals were perfused with a glutaraldehyde and paraformaldehyde mixture and the regenerated nerve histology was evaluated at two levels within the chamber (3 mm and midlevel) and 5 mm distal to the chamber. The myelinated nerve fibers were counted and compared for all levels and treatments. We found a disorganized endoneurium at midchamber level. Distally, a very low myelinated nerve fibers count was registered. No significant differences were observed between 10 and 60 μm meshes.

We conclude that 10 or 60 μm meshes do not control the massive invasion of the chamber by fibroblasts, leading to a highly disorganized regenerated nerve.

Key words: regeneration, peripheral nerve, intubation, fibroblast, permeability.

¹ Universidad de Caldas, Manizales, Colombia.

² Laboratorio de Neurociencias, Instituto Nacional de Salud, Santa Fe de Bogotá, D.C., Colombia

Introducción

A pesar de los grandes avances realizados en las técnicas microquirúrgicas de reparación del nervio periférico, aún se presentan limitaciones, sobre todo en lo concerniente a la recuperación funcional que no llega a ser completa en un porcentaje considerable de casos (1-3). En la búsqueda de soluciones a éste y otros problemas, se ha abierto el espacio a nuevos modelos de reparación entre los que tenemos el uso de neurotrofinas, injertos de células gliales y cámaras de regeneración. Esta última técnica consiste en introducir el nervio seccionado dentro de un tubo, dejando entre las extremidades proximal y distal un espacio que puede ser variable de acuerdo con el interés del investigador (4-9).

Los materiales de estas cámaras pueden ser diversos y van desde la utilización de materiales biológicos como venas, vainas mesoteliales (10), vainas perineurales (11), tubos de colágeno (12-13) y materiales sintéticos como silicona (14), ácido poli-D-láctico (8), acrílicos (15), polisulfonas y gore-tex, entre otros (4). Estudios recientes realizados con materiales sintéticos sugieren que las características físicas, químicas y eléctricas, así como la inclusión de geles dentro de estos canales, pueden generar cambios en el microambiente que optimizan los procesos de regeneración (1, 16). Al respecto se ha observado que las cámaras permeables y semipermeables conllevan a que los procesos de regeneración ocurran más rápido; por ejemplo, el número de fibras y el área de la estructura regenerada es mucho mayor que en cámaras impermeables (16-18). Además, es posible reparar defectos mayores. Sin embargo, una de las principales desventajas de estos sistemas es que el tejido regenerado, en ocasiones, crece en forma desorganizada, lo cual puede llevar a que las fibras regeneradoras colonicen blancos equivocados, hecho que puede originar problemas funcionales. De acuerdo con lo anterior, el presente trabajo busca analizar la influencia que puedan tener diferentes grados de permeabilidad de la cámara en el número de fibras y en la organización del nervio regenerado.

Materiales y métodos

Procedimiento quirúrgico de entubación

Se utilizaron 8 ratas adultas, cepa Wistar, con un peso promedio de 225 a 300 g. Se aplicó una

inyección subcutánea de atropina (0,07 mg/kg), y, después de diez minutos, los animales se anestesiaron con una mezcla de ketamina (90 mg/kg) y xilazina (15 mg/kg). A continuación se expuso el nervio ciático bajo estereoscopio a nivel medio del muslo y se cortó transversalmente con una microtijera quirúrgica. Luego de la sección, se colocó la cámara de regeneración de silicona de 14 mm de largo por 1,6 mm de diámetro interno y 4,8 mm de diámetro externo (Sigma Chemical Co.). Los muñones proximal y distal se introdujeron dos milímetros dentro de la cámara y se aseguraron a la misma con una sutura epineural utilizando un mononylon 9-0 (ethilon), y dejando una distancia de 10 mm entre los dos muñones. Esta cámara presentaba dos ventanas de 8 mm opuestas entre sí y cubiertas por una malla de nylon (Spectrum®) con poros de 10 (n=4) o 60 (n=4) micras (figura 1).

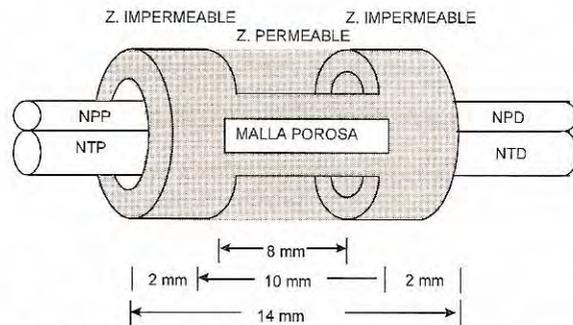


Figura 1. Diseño de la cámara de regeneración; NPP: nervio peroneo proximal; NTP: nervio tibial proximal; NPD: nervio peroneo distal; NTD: nervio tibial distal.

Procesamiento histológico. Después de seis meses de regeneración, los animales fueron anestesiados y perfundidos intraórticamente con una solución de lavado que contiene cloruro de sodio, 0,8%, glucosa, 0,1% y clorhidrato de procaína, 0,1%. A continuación se pasó el fijador modificado de Karnovsky, que contenía 2,5% de glutaraldehído y 2% de paraformaldehído en solución amortiguadora de fosfatos 0,2 M, pH 7,4. Nuevamente se expuso la parte media del muslo y se extrajeron las siguientes muestras: la primera, a tres milímetros dentro de la cámara; la segunda, en la parte media de la cámara y la tercera, cinco milímetros fuera de la cámara (nervios peroneo y tibial distales). A continuación

se hizo una fijación por inmersión de una hora, se lavaron las piezas y se postfijaron con tetraóxido de osmio, 2%, en solución amortiguadora de fosfato 0,2 M, pH 7,4, durante una hora. Se realizó un nuevo lavado; se deshidrataron los tejidos en concentraciones crecientes de etanol y se embebieron en Polybed 812 (Polysciences, Inc.). Se polimerizó a 60 °C durante 16 horas y se obtuvieron cortes semifinos transversales de 1 µm, que fueron coloreados con azul de toluidina al 0,5% preparada en solución acuosa de tetraborato de sodio al 1%. Finalmente, los cortes se secaron y montaron con Polymount®.

Análisis histológico y cuantitativo. En los dos grupos, se estudió la histología de la estructura regenerada en los tres niveles. Para los niveles segundo y tercero, se cuantificó el número de fibras mielínicas. Los datos obtenidos se analizaron utilizando un análisis de varianza de una vía que pretendía establecer si existía alguna influencia del tamaño del poro en el número de fibras regeneradas.

Resultados

Análisis histológico

Cámara. En los tratamientos evaluados, la estructura regenerada dentro de la cámara presentaba características morfológicas diferentes que estaban relacionadas con la presencia o no de la ventana recubierta con la malla porosa.

Nivel dentro de la cámara donde no se encuentra malla porosa (3 mm). La estructura regenerada es un monofascículo de gran tamaño con un crecimiento coaxial, que está envuelto por un tejido formado por células aplanadas tipo fibroblasto que siguen un patrón circunferencial. Este conjunto celular posee una red de vasos muy desarrollada y, en algunos casos, es posible encontrar minifascículos con fibras mielínicas en este tejido.

El endoneurio se caracteriza por la presencia de minifascículos envueltos por una capa delgada de tejido conectivo; dentro de éstos, se encuentran fibras mielínicas de diferentes diámetros, células de Schwann, fibroblastos y mastocitos; éstos últimos también se presentan

en el nivel del tejido circunferencial (figura 2). En algunas zonas endoneurales, no se presentan fibras sino una matriz rica en fibroblastos y tejido conectivo.

Nivel dentro de la cámara donde se encuentra ventana con malla porosa (nivel medio). A este nivel, el nervio regenerado se extiende hacia las ventanas y entra en contacto con el tejido conectivo que envuelve la cámara. El tejido conectivo circunferencial es más laxo que en la zona impermeable (figura 2).

En este nivel es notoria una desorganización a nivel intrafascicular, donde el endoneurio se organiza en minifascículos inmersos en un tejido conectivo muy laxo. Algunos de estos fascículos se presentan en forma circular y otros en forma longitudinal, rodeados por una capa de tejido conectivo y en los que las fibras mielínicas presentan varios diámetros, predominando las de pequeño calibre (figura 2). Las células encontradas son iguales a las del nivel donde no hay ventana.

Nervios peroneo y tibial distales. Se destaca la presencia de las envolturas epineural y perineural bien definidas. El epineuro posee una red vascular normal con vasos de diferente diámetro, donde es posible encontrar minifascículos con fibras mielínicas pequeñas. El epineuro se encuentra bien organizado (figura 2). La región endoneural se caracteriza por presentar fibras mielínicas de diferentes diámetros. En la mayoría de los casos, se observa más tejido conectivo endoneural que fibras regeneradoras. La red vascular endoneural está bien desarrollada (figura 2).

Análisis cuantitativo

En la figura 3, se presenta el promedio de fibras regeneradas en los tres niveles analizados. No se encontraron diferencias significativas entre la cantidad de fibras regeneradas en los dos tratamientos ($p > 0,05$). Es importante recalcar que si confrontamos la cantidad de fibras regeneradas presentes en la cámara y en los nervios distales (peroneo y tibial) en ambos tratamientos, encontramos una mayor cantidad de las mismas en la cámara, siendo este fenómeno más marcado en las cámaras de 60

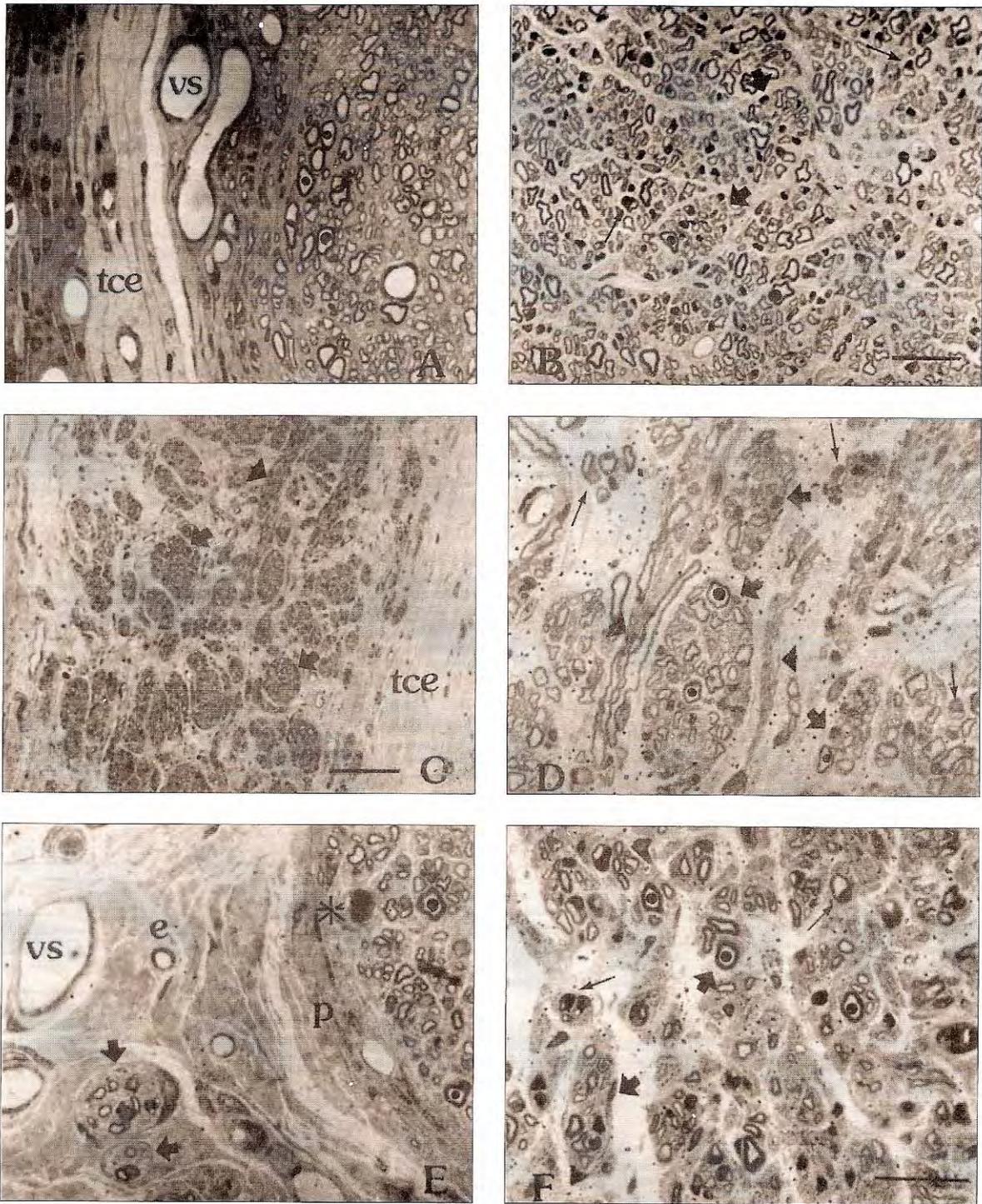


Figura 2. A-B: tres milímetros dentro de la cámara. C-D: parte media de la cámara. D-E: 5 mm fuera de la cámara. Tejido circunferencial (tce), epineurio (e), perineurio (p), vasos sanguíneos (vs), minifascículos transversales (▴), minifascículos longitudinales (▾), axones mielínicos normales (•), axones mielínicos degenerados (*), células de Schwann (→). A-B, D, E-F: barra=20 µm; C: barra=100 µm.

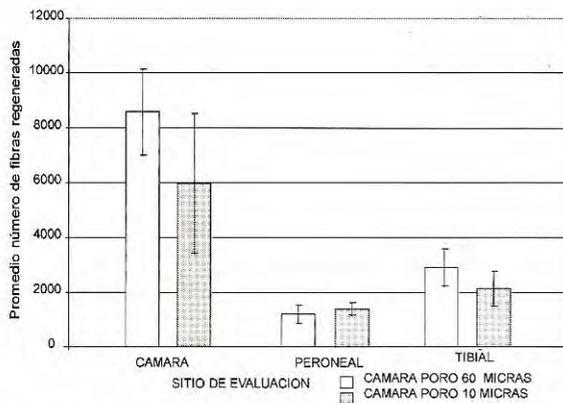


Figura 3. Promedio del número de fibras mielínicas regeneradas en la parte media de la cámara y a 5 mm fuera de la cámara (nervios peroneo y tibial).

μm ($p < 0,001$), que en las cámaras de 10 μm ($p < 0,05$). Al parecer, tampoco existe una tendencia de colonización a nivel distal ($p > 0,05$).

Discusión

La reparación y la recuperación funcional después de una lesión de nervio periférico dependen de una multitud de factores tanto intrínsecos como extrínsecos a la neurona (19). Así, en los sistemas experimentales de reparación como las cámaras de regeneración, las características de permeabilidad del material utilizado influyen en la tasa de sucesos y en la morfología del nervio periférico en regeneración (6, 16, 20-23). La cámara evaluada por nosotros se comporta como un sistema de compartimentos en donde la presencia o no de la ventana recubierta por la malla afecta la estructura morfológica de esta zona y el número de fibras a nivel distal. Es posible que esta división en compartimentos se deba más a la entrada de tejido cicatricial que a la entrada de factores difusibles. Este hecho se ve reforzado por la estructura histológica del nervio regenerado en la zona no permeable, que es similar a lo informado sobre sistemas completamente impermeables (24, 25).

La entrada masiva de tejido cicatricial a la parte media de la cámara (zona permeable), da origen a un tejido muy desorganizado (26). Es posible que la formación de éste impida o disminuya la regeneración de los axones en crecimiento (27).

Este fenómeno se observa al comparar la cantidad de fibras presentes en la parte media de la cámara y en los nervios tibial y peroneo distales. Es importante señalar que nuestros hallazgos son contrarios a varios informes sobre otros modelos de tubos impermeables, en los cuales es mayor el número de fibras a nivel distal (18-25). Los datos existentes en la literatura muestran que la entrada de células a las cámaras permeables incrementa el número de fibras mielínicas y estimula la regeneración (6, 28, 29).

¿Cómo puede explicarse, entonces, esta franca contradicción con nuestros resultados? El punto importante es el grado de perturbación de la matriz ocasionada por esta entrada de células. Si el aporte de células es masivo y en un sector muy grande de la cámara (como sucede en nuestro caso), la desorganización de la matriz es tal que se genera un tejido también desorganizado, con muchos fibroblastos y colágeno, y que, además, no se disponen en la forma longitudinal que se presenta en el nervio normal, hechos éstos que dificultan la regeneración.

En los otros informes, la entrada de células es más controlada ya que se realiza en un sector mucho menor de la cámara. Como resultado, el grado de desorganización también es menor y se presenta una estimulación de la regeneración. Estos hechos nos llevan a la conclusión de que la situación ideal es aquella en la cual hay un aporte de células, pero organizadas de tal forma que estimulen la regeneración. Tal es el caso de la implantación de células (obtenidas a partir de cultivos *in vitro*), en cantidades adecuadas e inmersas en matrices que permitan su supervivencia, su organización y su efecto positivo sobre las fibras en regeneración.

Esta es la vía que la ingeniería de tejidos está postulando en la actualidad, con la propuesta de creación de prótesis bioartificiales, utilizando implantes de células de Schwann y diversos tipos de matrices incluidas en una cámara de material sintético biodegradable (23, 30-32). De esta forma, se podrán reparar defectos importantes, conservando un adecuado nivel de organización en las cámaras, evitando la formación de

neuromas y, por tanto, logrando una mejor especificidad de la regeneración. Se sabe que la adición a la cámara de ciertos tipos celulares y moléculas como factores neurotróficos y de matriz, entre otros, logran que los procesos de regeneración sean mas rápidos y que las distancias grandes entre los muñones seccionados se puedan reparar con éxito (33-36).

Agradecimientos

Este trabajo fue financiado parcialmente por Colciencias (proyecto 2104-05-001-91).

Referencias

1. **Butí M, Verdú E, Labrador RO, Vilches JJ, Forés J, Navarro X.** Influence of physical parameters of nerve chambers on peripheral nerve regeneration and reinnervation. *Exp Neurol* 1996;137:26-33.
2. **Danielsson P, Dahlin I, Polvsen B.** Tubulization increases axonal outgrowth of rat sciatic nerve after crush injury. *Exp Neurol* 1996;139:238-43.
3. **Rende M, Granato A, Lo Monaco M, Zelano G, Toesca A.** Accuracy of reinnervation by peripheral nerve axons regenerating across a 10 mm gap within an impermeable chamber. *Exp Neurol* 1991;111: 332-9.
4. **Danielsen N, Williams LR, Dahlin LB, Varon S, Lundborg G.** Peripheral nerve regeneration in gore-tex chamber. *Scand J Plast Reconstr Surg* 1988;22:207-10.
5. **Den Dunnen WF, Van Der Lei B, Robinson P, Holwerda A, Pennings AJ, Schakerraad JM.** Biological performance of a degradable poly (lactic acid-caprolactone) nerve guide: influence of tube dimensions. *J Biomed Mater Res* 1995;29:757-66.
6. **Hurtado H.** Efecto de la permeabilidad en la regeneración del nervio ciático de rata entubado. *Biomédica* 1997;17: 27-33.
7. **Knoops B, Hurtado H, Van Den Bosch de Aguilar P.** Rat sciatic nerve regeneration within an acrylic semipermeable tube and comparason with a silicone impermeable material. *J Neuropathol Exp Neurol* 1990;438-448.
8. **Kosaka M.** Enhancement of rat peripheral nerve regeneration through artery-including silicone tubing. *Exp Neurol* 1990;107:66-77.
9. **Valentini RF, Aebischer P.** Strategies for the engineering of peripheral nervous tissue regeneration. In: Lanza R, Langer R, Chick W, editors. *Principles of tissue engineering*. 1997:671-684.
10. **Lunborg G, Dahlin LB, Danielsen NP, Hansson HA, Larsson K.** Reorganization and orientation of regenerating nerve fibres, perineurium, and epineurium in preformed mesothelial tubes: an experimental study on the sciatic nerve of rats. *J Neurosci Res* 1981;6:265-81.
11. **Restrepo Y, Merle M, Petry D, Michon J.** Empty perineural tube graft used to repair a digital nerve: a first case report. *Microsurgery* 1985;6(2):73-7.
12. **Gómez N, Cuadras J, Butí M, Navarro X.** Histologic assesment of sciatic nerve regeneration following resection and graft or tube repair in the mouse. *Rest Neurol Neurosc* 1996;10:181-96.
13. **Navarro X, Rodríguez FJ, Labrador RO, Butí M, Ceballos D, Gomez N, et al.** Peripheral nerve regeneration through bio-resorbables and durable nerve guides. *J Periph Nerv System* 1996;1:53-4.
14. **Sutachan JJ.** Estudio de la especificidad de reinervación de los nervios tibial y peroneo utilizando la técnica de la entubación (tesis). 1996.
15. **Hurtado H, Knoops B, Van Den Bosch de Aguilar P.** Rat sciatic nerve regeneration in semipermeable artificial tubes. *Exp Neurol* 1987;97:751-7.
16. **Valentini RF, Aebischer SR, Winn, Galletti PM.** Collagen and laminin containing gels impede peripheral nerve regeneration through semipermeable nerve guidance channels. *Exp Neurol* 1987;95:350-6.
17. **Jenq CB, Coggeshall RE.** Nerve regeneration through holey tubes. *Brain Res* 1985;361:233-41.
18. **Hurtado H.** Peripheral nervous system regeneration in the adult rat : "The regeneration chamber model" (tesis). Lovaina (Bélgica): Universidad Católica de Lovaina; 1990.
19. **Fu SY, Gordon T.** The cellular and molecular basis of peripheral nerve regeneration. *Mol Neurobiol* 1997;14(1):67-116.
20. **Aebischer P, Guénard V, Winn SR, Valentini RF, Galletti PM.** Blind-ended semipermeable guidance channels support peripheral nerve regeneration in the absence of a distal nerve stump. *Brain Res* 1988;1-2:79-187.
21. **Aebischer P, Guénard V, Brace S.** Peripheral nerve regeneration through blind-ended semipermeable guidance channels: effect of the molecular weight cutoff. *J Neurosci* 1989;10:3590-5.
22. **Valentini RF, Aebischer P, Winn SR, Galletti PM.** Collagen and laminin containing gels impede peripheral nerve regeneration through semipermeable nerve guidance channels. *Exp Neurol* 1987;98(2):350-6.
23. **Heath CA, Rutkowski GE.** The development of bioartificial nerve grafts for peripheral-nerve regeneration. *Tibtech* 1998;16:163-8.
24. **Aizate LH, Sutachán JJ, Hurtado H.** An anterograde degeneration study of the distribution of regenerating mylinated fibers in the silicone chamber model. *Sometido a evaluación Neuroci Lett*.
25. **Le Beau JM, Ellisman M, Powell HC.** Ultrastructural and morphometric analysis of long-term peripheral nerve regeneration through silicone tube. *J Neurocytol* 1988;17:161-172.

26. **Mackinnon SE, Lee Dellon A, Hudson AR, Hunter DA.** Alteration of neuroma formation by manipulation of its microenvironment. *Plast Reconstr Surg* 1985;76(3):345-52.
27. **Terzis JK, Smith KL.** The peripheral nerve. Structure, function and reconstruction. Virginia: Raven Press, 1990.
28. **Jenq CB, Jenq LL, Coggeshall RE.** Nerve regeneration changes with filters of different pore size. *Exp Neurol* 1987;97:662-71.
29. **Jenq CB, Coggeshall RE.** Permeable tube increase the length of the gap that regenerating axons can span. *Brain Res* 1987;482:239-42.
30. **Borkenhagen M, Clémence JF, Sigrist H, Aebischer P.** Three-dimensional extracellular matrix engineering in the nervous system. *J Biomed Mater* 1998;40:392-400.
31. **Chamberlin LJ, Yannas IV, Hsu HP, Strichartz G, Spector M.** Collagen-GAG substrate enhances the quality of nerve regeneration through collagen tubes up to level of autograft. *Exp Neurol* 1998;154:315-29.
32. **Krewson CE, Chung SW, Dai W, Saltzman WM.** Cell aggregation and neurite growth in gels of extracellular matrix molecules. *Biotech Bioeng* 1994;43:555-62.
33. **Bellamkonda R, Aebischer P.** Review: Tissue engineering in the nervous system. *Biotech Bioeng* 1994;43:543-54.
34. **Labrador RO, Butí M, Navarro X.** Influence of collagen and laminin gels concentration on nerve regeneration after resection and tube repair. *Exp Neurol* 1998;149:243-352.
35. **Guénard V, Kleitman N, Morrissey TK, Bunge RP, Aebischer P.** Syngenic Schwann cells derived from adult nerves seeded in semipermeable guidance channels enhance peripheral nerve regeneration. *J Neurosci* 1992;12(9):3310-20.
36. **Levi AD, Sonntag VH, Dickman C, Mather J, Li RH, Cordoba S, Bichard B, Berens M.** The role of cultured Schwann cell grafts in the repair of gaps within the peripheral nervous system of primates. *Exp Neurol* 1997;143:25-36.