

Cambios histológicos y electrofisiológicos en lesiones de nervio periférico tratadas con glicina. Estudio experimental

Dra. Krystell Padilla-Martín,* Dr. Juan Bernardo Baltazar-Rendón,** Dr. Raymundo B Priego-Blancas,**
Dra. Rebeca Uribe-Escamilla,* Dr. Alfonso Alfaro-Rodríguez***

RESUMEN

El tratamiento de las lesiones de nervio periférico se enfoca principalmente en el tipo de daño. Se han utilizado múltiples factores para mejorar el crecimiento del cono axonal: NGF, GABA, etc. El flujo de una cantidad significativa de glicina abre los canales iónicos del receptor NMDA, altamente permeables al calcio, regulando el magnesio extracelular bajo la influencia del voltaje. En este estudio se utilizaron ratas Wistar. El nervio ciático se disecó en ambas patas para realizar estudios electrofisiológicos; posteriormente se seccionó el izquierdo, reparándolo con técnica epineural. Después se realizó otro estudio electrofisiológico para asegurar que no existían fibras colaterales. Se trataron de la siguiente manera: Grupo 1 por 15 días, Grupo 2 por 30 días y Grupo 3 por 60 días; se administró glicina a dosis de 40 mM/kg/d/ip; los Grupos 4, 5 y 6 con solución salina. Al término se realizó electrofisiología y se reseco el nervio para histología. Los resultados mostraron regeneración morfológica un mes después de la lesión del nervio, así como una recuperación funcional progresiva; aunque no estaba completamente recuperada era mayor en las ratas con glicina. Histológicamente, existen diferencias: el nervio tratado con glicina es similar a los cortes de nervios no lesionados.

Palabras clave: Glicina, lesión nerviosa, nervio periférico, crecimiento nervioso, receptores NMDA, modelo animal.

SUMMARY

Peripheral nerve injuries treatment focuses on the type of lesion. Different factors have been used to help nerve stump growth: NGF, GABA, etc. Glycine significant overflow opens NMDA receptor ionic channels highly permeable to Ca^{+} , which regulates extracellular magnesium under the influence of voltage. Wistar rats were used as subjects in this study. The sciatic nerve was exposed in both legs for the electrophysiology procedure to be performed; next, the left nerve was cut transversally and sutured back in place with the epineural technique. After that, a new electrophysiology test was performed to ensure there were no collateral fibers. Study Groups were given glycine 40 mM/kg/d/ip for 15, 30 days and 60 days, while Groups 4, 5, 6 were treated with saline solution 0.9%. Then a new electrophysiological study was performed and the sciatic nerve was prepared for the histopathology study. Results showed a morphologic regeneration occurred 1 month after the nerve injury was done as well as progressive functional recovery, even though it was not completely recovered it was greater in the rats treated with glycine. According to histology, there are differences nerves treated with glycine are similar to not injured nerves.

Key words: Glycine, nerve injury, peripheral nerve, nerve stump grown, NMDA receptor, animal model.

INTRODUCCIÓN

En los Estados Unidos, las lesiones del nervio periférico son comunes, representan el 2.8% de todas las lesiones traumáticas en general y el 65% ocurren en el miembro superior y, especialmente, en el nervio radial.¹ Cuando existe un daño severo en un nervio periférico, las fibras sensoriales producen múltiples impulsos, los cuales duran de unos segundos a varios minutos y se conocen como «injury discharge».²

* Laboratorio de Neuroquímica, Instituto Nacional de Rehabilitación. SSA. México.

** Servicio de Cirugía Plástica y Reconstructiva, Hospital General de México. SSA. México.

*** Laboratorio de Microscopia Electrónica, Instituto Nacional de Pediatría. SSA, México.

El tratamiento en la reconstrucción de una lesión nerviosa se enfoca en el tipo de lesión y va desde el expectante hasta la reparación interfascicular. Se han realizado múltiples estudios con diferentes factores para mejorar el crecimiento del cono axonal como: NGF (factor de crecimiento nervioso), PGF (factor de crecimiento plaquetario), ácido hialurónico, GABA, y otros más.³

La velocidad de crecimiento en la Unidad de Regeneración depende de la especie; en ratas varía de 2 a 3.5 mm por día, mientras que en humanos el crecimiento más rápido varía de 1 a 2 mm por día con una desaceleración progresiva cuando el axón se vuelve más distal.⁴

En la glicina, los péptidos y la subunidad α (ligación y adhesión) son considerados piezas fundamentales para la formación del receptor de glicina en comparación con los grandes polipéptidos periféricos conocidos como proteína estructural, la Gephyrin que une a los receptores con sinapsis a los microtúbulos adyacentes.^{5,6}

Un flujo significativo de glicina abre los canales iónicos del receptor NMDA (N-metil-D-aspartato), los cuales son altamente permeables al Ca^{2+} , que regula el magnesio extracelular bajo influencia eléctrica. Para ser activados, estos receptores dependen de dos agonistas: el glutamato y la glicina.^{6,7}

El canal iónico NMDA está ubicado en las neuronas postsinápticas del cuerno dorsal; por lo tanto, una lesión nerviosa produce un incremento importante del glutamato espinal que abre los canales NMDA, causando un flujo interno de Ca^{2+} y Na^{+} , el cual provoca mayor respuesta de la célula postsináptica.^{8,9}

En una lesión, cuando la generación de radicales libres es más importante que los mecanismos antioxidantes, se induce el incremento en la permeabilidad celular, así como el decremento en el potencial de membrana. El efecto de la glicina sobre las enzimas antioxidantes se puede deber al bloqueo de este aminoácido en la activación de las células de Kupffers, las cuales son productoras de radicales libres de oxígeno, nitrógeno y citoquinas, por lo que, en concentraciones altas, incrementan el daño isquemia-reperusión. Este bloqueo detiene la activación de estos factores sobre las enzimas antioxidantes con la restauración de los valores normales de éstos.¹⁰

En modelos de animales con lesión nerviosa periférica, se ha comprobado que la infusión intratecal de glicina disminuye la hiperalgesia terminal, lo que sugiere que la glicina puede disminuir los síntomas de dolor neuropático.¹¹⁻¹³ Otros estudios muestran que la administración de glicina en ratas con lesión de espina dorsal genera una recuperación más rápida y de

mejor calidad en comparación con los animales, sin la administración de este aminoácido.^{14,15}

MATERIAL Y MÉTODO

Animales

Se utilizaron 35 ratas Wistar machos adultas, con peso promedio de 225 g; 15 fueron estudiadas con glicina, 15 sin glicina y 5 como grupo control. Las ratas fueron colocadas 5 por caja en condiciones estándares de laboratorio con ciclos de 12 horas de luz y sombra, la alimentación fue *ad libitum*.

Los animales fueron tratados de acuerdo con los estándares internacionales de manejo de animales de laboratorio.¹⁶ El procedimiento fue aprobado por los Comités de Ética e Investigación del Instituto Nacional de Rehabilitación en la ciudad de México.

Los animales fueron divididos en seis grupos de acuerdo a los días de administración de la glicina:

- Grupo 0: grupo control ($n = 5$);
- Grupo 1, 2 y 3: cirugía de nervio periférico y administración de solución salina intraperitoneal (i. p.) por 15, 30 y 60 días, respectivamente ($n = 15$);
- Grupo 4: cirugía de nervio periférico y la administración de glicina i. p. por 15 días ($n = 5$);
- Grupo 5: cirugía y administración de glicina i. p. por 30 días ($n = 5$);
- Grupo 6: cirugía y administración de glicina i. p. por 60 días ($n = 5$).

Procedimiento quirúrgico

Todos los animales ($n = 35$) fueron intervenidos quirúrgicamente bajo anestesia general mediante la administración de una mezcla de ketamina y xilazina (80 mg/kg y 8 mg/kg peso corporal) de manera intraperitoneal, lo cual fue suficiente para todo el procedimiento. La superficie medial del muslo izquierdo y derecho fue preparada en todos los animales, rasurándola y realizando la antisepsia con una solución de Isodine® y alcohol al 20%, colocando campos estériles en la zona operatoria. El nervio ciático fue expuesto mediante una incisión antero-medial y longitudinal, la cual se orientó del trocánter mayor al cóndilo medial del fémur, seguido por una disección roma entre los músculos abductores anteriores. El nervio se observó en toda su longitud, pero sólo fue separado del tejido blando adyacente en su tercio medio. Se usó un microscopio quirúrgico de 40x para manejar el nervio ciático durante cada paso del procedimiento quirúrgico. En el Grupo 0 se expuso y se

cerró por planos; en el resto de los Grupos, el nervio ciático fue expuesto, se realizó el procedimiento electrofisiológico y posteriormente el nervio izquierdo fue seccionado de manera transversal y reparado con una técnica epineural con 4 puntos separados de nylon 9/0. Por último, se realizó un nuevo estudio electrofisiológico para tener una certeza de que no existían fibras colaterales en dicho nervio. Finalmente, se cerró la incisión por planos.

Cuando el efecto anestésico disminuyó, se puso a las ratas en sus cajas de confinamiento y alimentadas *at libitum* hasta el fin del experimento.

Medicamentos

A los Grupos 4, 5, 6 ($n = 5$ por Grupo) se le administró glicina (SIGMA) i.p., con una concentración de 40 mM/kg en solución isotónica. Ésta se administró diariamente entre las 11 am y 12 pm, de acuerdo con el tiempo programado de 15, 30 y 60 días respectivamente.

En los Grupos 1, 2, 3 ($n = 5$ por Grupo) se les administró una solución salina isotónica al 0.9% i.p. de la misma manera y días que la glicina.

Electrofisiología

El estudio electrofisiológico se realizó en las ratas bajo las mismas condiciones anestésicas referidas anteriormente. El registro se realizó antes y después de la sección nerviosa para verificar que no existían fibras colaterales. El nervio ciático fue disecado en toda su longitud y se aplicó el estímulo eléctrico a través de un electrodo bipolar con pulsaciones 0.2 ms supramáximo de 8V. Los potenciales fueron registrados del músculo gastrocnemio, con un electrodo de aguja y graficados de manera digital (modelo Cadwell 3000).

Al final del tiempo programado para cada Grupo se anestesió a las ratas nuevamente, se disecó el muslo izquierdo y se expuso el nervio para realizar un nuevo estudio electrofisiológico en la zona proximal a la reparación nerviosa. Solamente se verificó que hubiera conducción nerviosa y se midieron las ondas de latencia y amplitud para evaluar si existían diferencias significativas entre los Grupos 4, 5, 6, contra 1, 2, y 3.

Evaluación patológica

Antes de que los animales fueran sacrificados en los días 15, 30 y 60 postoperatorios con una inyección intraperitoneal de pentobarbital sódico (Anestesal Pfizer®, 120 mg/kg peso corporal), se retiró completa-

mente el nervio ciático donde se produjo la lesión, con una longitud de 8 mm proximales y 10 mm distales a la lesión.

Los segmentos nerviosos se deshidrataron en una solución de alcohol etílico en concentraciones ascendentes y posteriormente incluidas en resina epóxica (Poly Bed-812®, Polysciences Inc.). Se realizaron múltiples cortes, con un ultramicrotomo (MT 6000-XL, RMC Inc.), de los segmentos nerviosos, iniciando del sitio de la reparación hacia la porción distal. Los cortes fueron teñidos con azul de toluidina al 1% y examinados con un microscopio de luz (Zeiss Axiophoto) equipado con videocámara y conectado a una computadora cargada con el programa KS 400 Measure Interactive (versión 2.0).

Análisis de datos

Todos los datos se expresan en medias $\pm$ SD. La prueba paramétrica comparativa de Wilcoxon se utilizó para el análisis estadístico de latencias y amplitudes del mismo grupo antes y después de la lesión con un nivel de significancia de $p \leq 0.05$. La prueba no paramétrica de Mann-Whitney se utilizó para el análisis estadístico en la comparación de latencias y amplitudes entre los grupos de control y estudio, 60 días posteriores a la cirugía, usando SPSS 10.0 (Inc., Chicago, IL), con un nivel de significancia $p \leq 0.05$.

RESULTADOS

Los procedimientos anestésicos y quirúrgicos se realizaron sin complicaciones y fueron tolerados perfectamente por todos los animales, los cuales no presentaron ningún síntoma de infección. En el Grupo 0, las huellas de la garra derecha se encontraron completamente separadas al segundo día de la cirugía, el peso era el mismo, completamente normal. En los otros grupos, donde se les realizó la reparación nerviosa, la contractura inicial de flexión y la abducción de la pata de las ratas se recuperó gradualmente, así como la capacidad de pararse y caminar sobre esa pata; sin embargo, el peso que se aplicaba a dicha extremidad nunca se recuperó aun después de las 4 semanas postoperatorias.

Evaluación electrofisiológica

La prueba Wilcoxon se utilizó para comparar amplitudes y latencias en los Grupos antes y después de la lesión y reparación nerviosa para reportar los valores p . La prueba mostró que no existen diferencias significativas entre los grupos.

Los Grupos del día 15 (1 y 4) no presentaron ningún registro electrofisiológico en este periodo.

La prueba Mann–Whitney se utilizó para comparar los resultados de amplitudes y latencias entre los grupos con y sin tratamiento a base de glicina al mes y dos meses posteriores a la lesión del nervio periférico, obteniendo una $p = 0.690$ para amplitudes y $p = 0.841$ para latencias.

Evaluación patológica

La figura 1 consiste en microfotografías de nervios lesionados a los 15, 30 y 60 días después de la cirugía reparadora con y sin tratamiento a base de glicina.

La morfología interna del nervio fue completamente normal en el Grupo 0 (Figuras 1 A, B y C), con las típicas fibras mielinizadas de diferentes diámetros distribuidas en fascículos individuales.

En los Grupos 1, 2 y 3 (sin glicina) se observaron datos típicos de degeneración walleriana, con pérdida avanzada axonal, residuos de mielina, vacuolas y macrófagos fagocitando glicina degenerada y mastocitos. En el día 15 (Figura 1 D), encontramos restos axonales y zonas con apariencia normal, con macrófagos y mastocitos. Al mes (Figura 1 E), había una mayor cantidad de macrófagos y zonas con muchas vacuolas y axones con apariencia normal. A los dos meses (Figura 1 F), el tejido

conectivo predominó, y se observan algunos núcleos celulares indiferenciados en algunas muestras con pequeños grupos de axones que se encuentran en regeneración.

En el Grupo tratado con glicina (Figuras 1 G, H e I) presentaron nervios en regeneración y las muestras con una mayor cantidad de tejido conectivo y graso; había una mayor cantidad de fibras con mielina, con un menor diámetro y disposiciones irregulares que el grupo sin tratamiento. La menor densidad axonal y la presencia de fibras con menor diámetro muestran que existen brotes de crecimiento en los axones dañados y que están creciendo a diferente velocidad, como se ve en las fotografías con diámetros diferentes.

DISCUSIÓN

Los resultados electrofisiológicos muestran que al día 15 después de la lesión y reparación nerviosa, no existe conducción nerviosa, pero al mes y a los dos meses después de la lesión, hay conducción en ratas con y sin tratamiento con glicina.

Todas las lesiones de nervio periférico van seguidas por un colapso de la membrana axonal, fuga de axoplasma y un intenso intercambio iónico; por otro lado, los iones extracelulares (Na^+ , Ca^+) entran en la fibra, mientras los iones intracelulares (K^+) se escapan de ella, por lo que el axoplasma se vuelve más po-

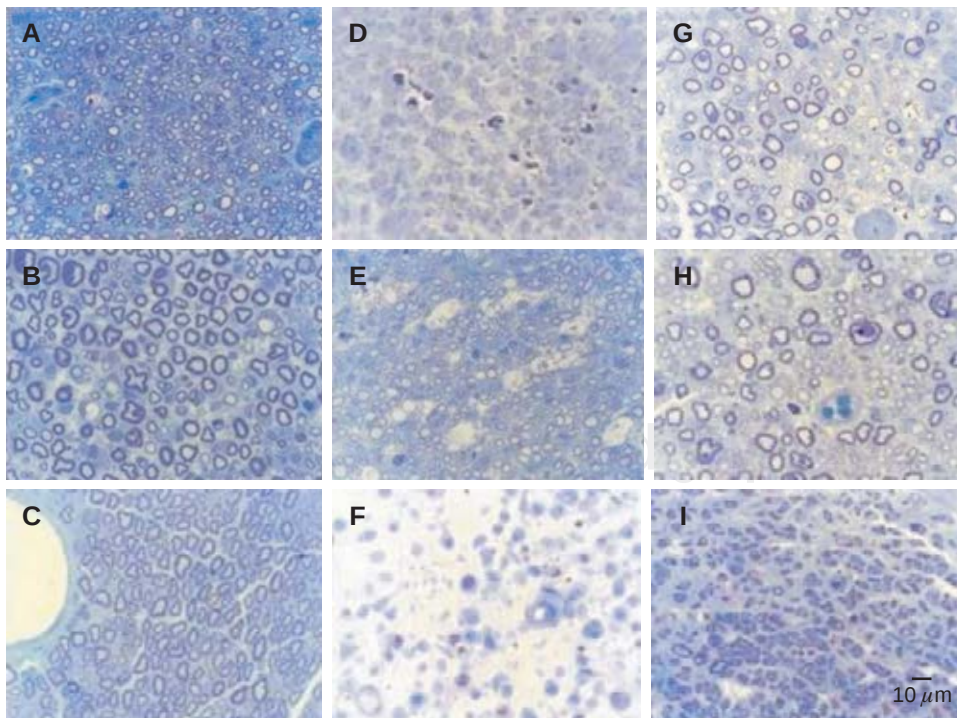


Figura 1. Microfotografías representativas del nervio ciático. **A, B y C.** Grupo control sin lesión. **D.** Grupo sin tratamiento 15 días después de la lesión. **E.** Grupo sin tratamiento 1 mes después de la lesión. **F.** Grupo sin tratamiento 2 meses después de la lesión. **G.** Grupo con tratamiento con glicina 15 días después de la lesión. **H.** Grupo con tratamiento con glicina 1 mes después de la lesión. **I.** Grupo con tratamiento con glicina 2 meses después de la lesión.

sitivo. Los componentes intracelulares como las mitocondrias, emigran hacia el sitio de la lesión: aquéllos en el segmento proximal se mueven de manera distal y los del segmento distal se mueven de manera proximal, es decir, de un ambiente menos positivo hacia uno más positivo.^{17,18}

De acuerdo con nuestros resultados, en el grupo con glicina se da una mayor regeneración morfológica al mes de la reparación epineural del nervio lesionado, así como una recuperación funcional progresiva, aunque no es completa, como la que se observa a los dos meses en nervios sin el suplemento de glicina. Pero, de acuerdo con la histología, existe una gran diferencia entre los cortes de los nervios que recibieron glicina y los que no. La histología del nervio reparado con glicina tiene una morfología más parecida a un nervio normal.

Estos resultados son debidos a la acción de la glicina en las células de Kupffer y otras células blancas, que induce un flujo intracelular de Cl^- y produce una hiperpolarización de las membranas, previniendo el incremento intracelular de Ca^{++} ,¹⁹⁻²¹ lo que es producido por muchos estímulos como la lesión nerviosa, endotoxina, hipoxia, etc. Sin embargo, la glicina bloquea los estímulos intracelulares y la producción de citoquina, lo que inhibe el proceso inflamatorio y la degeneración walleriana, y también regula la formación de tejido cicatrizal intra y extraaxonal.²²⁻²⁴

Obviamente, el nervio estaba muy deteriorado con el tiempo, pero es importante resaltar que la presencia de pequeños grupos de axones en el Grupo 6 indicaron reinervación, a diferencia de los no administrados con glicina; en estos grupos se destruyeron los axones y a los dos meses algunas muestras presentaron pocas fibras regeneradas.

Finalmente, es necesario llevar este estudio al siguiente nivel de investigación para que se proponga a este aminoácido como tratamiento adyuvante en los casos de lesiones de nervio periférico en humanos, principalmente en el miembro superior, ya que se ha demostrado que la glicina no causa algún efecto indeseable en animales o en humanos; la glicina vía oral permite que la concentración sanguínea sea mayor a 1 mM; una concentración de 0.1 a 0.2 mM y protege de daños causados por endotoxinas en un choque tóxico.^{10,25-27}

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo fue apoyado por el Instituto Nacional de Rehabilitación.

Gracias a la participación del Dr. Alberto Nuño Licona por la realización de los estudios de electrofisiología.

BIBLIOGRAFÍA

1. Nichols CM, Brenner MJ, Fox IK, Tung TH, Hunter DA, Rickman SR, MacKinnon SE. Effect of motor *versus* sensory nerve grafts on peripheral nerve regeneration. *Exp Neurol* 2004; 190: 347-355.
2. Seltzer Z, Cohn S, Ginzburg R, Beilin B. Modulation of neuropathic pain behavior in rats by spinal disinhibition and NMDA receptor blockade of injury discharge. *Pain* 1991; 45: 69-75.
3. Terzis J, Smith K. Nerve repair. In: McCarthy. Plastic Surgery. NY, USA: Saunders (Ed), 1990: pp. 630-697.
4. Birch R. Nerve repair. In: Green D. Operative hand surgery. Edinburgh, Eng: Churchill Livingstone (Ed). 2005: pp. 1075-1112.
5. Todd AJ, Watt C, Spike RC, Sieghart W. Co localization of GABA, glycine, and their receptors at synapses in the rat spinal cord. *J Neurosci* 1996; 16: 974-982.
6. Eleore L, Vassias I, Vidal PP, Triller A, Waele C. Modulation of glycine receptor subunits and gephyrin expression in the rat facial nucleus after axotomy. *Eur J Neurosci* 2005; 21: 669-678.
7. Bordini F, Quartaroli M. Modulation of nociceptive transmission by NMDA/glycine site receptor in the ventroposterolateral nucleus of thalamus. *Pain* 2000; 84: 213-224.
8. Wallace MS, Rowbotham MC, Katz NP, Dworkin RH, Dotson RM, Galer BS et al. A randomized, double-blind, placebo-controlled trial of a glycine antagonist in neuropathic pain. *Neurology* 2002; 59: 1694-700.
9. Quartaroli M, Carignani C, Dal Forno G, Mugnaini M, Ugolini A, Arban R et al. Potent antihyperalgesic activity without tolerance produced by glycine site antagonist of N-Methyl-D-Aspartate receptor GV196771A. *J Pharmacol Exp Ther* 1999; 290: 158-169.
10. Matilla B, Mauriz JL, Culebras JM, González-Gallego J, González P. Glycine: a cell-protecting anti-oxidant nutrient. *Nutr Hosp* 2002; 17: 2-9. Review. Spanish.
11. Sorkin LS, Puig S. Neuronal model of tactile allodynia produced by spinal strychnine: effects of excitatory amino acid receptor antagonists and a μ -opiate receptor agonist. *Pain* 1996; 68: 283-292.
12. Kish PE, Fischer-Bovenkerk C, Ueda T. Active transport of γ amino butyric acid and glycine into synaptic vesicles. *Proc Natl Acad Sci* 1989; 86: 3877-3881.
13. Fisher K, fundytus ME, Cahill CM, Coderre TJ. Intrathecal administration of the mGluR compound, (S) - 4CPG, attenuates hyperalgesia and allodynia associated with sciatic nerve constriction injury in rats. *Pain* 1998; 77: 59-66.
14. Somers DL, Clemente FR. Dorsal horn synaptosomal content of aspartate, glutamate, glycine and GABA are differentially altered following chronic constriction injury on the rat sciatic nerve. *Neurosci Lett* 2002; 323: 171-174.
15. Hwang, JH, Yaksh, TL. The effect of spinal GABA receptor agonists on tactile allodynia in a surgically induced neuropathic pain model in the rat. *Pain* 1997; 70: 15-2.
16. Oficial Mexican Norm NOM-062-Z00-1999. *Technical specifications for the production, care and use of laboratory animals*.
17. Mendonc CA, Barbieri HC, Mazzer N. Directly applied low intensity direct electric current enhances peripheral nerve regeneration in rats. *J Neurosc Meth* 2003; 129: 183-190.
18. Bowery NG, Smart TG. GABA and glycine as neurotransmitters: a brief history. *Br J Pharmacol* 2006; 147: S109-S119.
19. Decker K. Biologically active products of stimulated liver macrophages (Kupffer cells). *Eur J Biochem* 1990; 192: 245-261.

20. Ikejima K, Iimuro Y, Forman DT, Thurman RG. A diet containing glycine improves survival in endotoxin shock in the rat. *Am J Physiol* 1996; 271: G97-G103.
21. Wheeler MD, Ikejima K, Enomoto N. Glycine: A new anti-inflammatory immunonutrient. *Cell Mol Life Sci* 1999; 56: 843-856.
22. Belzberg AJ, Campbell JN. Evidence for end-to-side sensory nerve regeneration in a human. Case report. *J Neurosurg* 1998; 89: 1055-7.
23. Lundborg G, Zhao Q, Kanje M, Danielsen N, Kerns JM. Can sensory and motor collateral sprouting be induced from intact peripheral nerve by end-to-side anastomosis? *J Hand Surg* 1994; 19: 277-82.
24. Miller GW, Lock EA, Schnellmann RG. Strychnine and glycine protect renal proximal tubules from various nephrotoxics and act in the late phase of necrotic cell injury. *Toxicol Appl Pharmacol* 1994; 125: 192-197.
25. Khan M, Ron Van Der Wieken L, Riezebos RK, Tijssen JG, Kiemeneij F, Slagboom T et al. Oral administration of glycine in the prevention of restenosis after coronary angioplasty. A double blind placebo controlled randomized feasibility trial evaluating safety and efficacy of glycine in the prevention of restenosis after angioplasty. *Acute Card Care* 2006; 8: 58-64.
26. Gusev EI, Skvortsova VI, Komissarova IA, Dambinova SA, Raevskii KS, Alekseev AA et al. Neuroprotective effects of glycine in the acute period of ischemic stroke. *Zh Nevrol Psikhiatr Im S S Korsakova* 1999; 99: 12-20.
27. Carvajal-Sandoval G, Medina-Santillán R, Juárez E, Ramos-Martínez G, Carvajal-Juárez ME. Effect of glycine on hemoglobin glycation in diabetic patients. *Proc West Pharmacol Soc* 1999; 42: 31-2.

Dirección para correspondencia:
Dra. Krystell Padilla-Martín
Av. México-Xochimilco Núm. 289,
Arenal de Guadalupe,
Delegación Tlalpan
14389 México, D.F.
Tel. (0155) 5999 1000, Ext. 19303.
Correo electrónico: krystellp@yahoo.com