

Comparación entre el injerto de nervio ciático *in situ* y el injerto de vena con plasma rico en plaquetas. Estudio experimental en conejos

Dr. Miguel de la Parra Márquez,* Dr. Axel de la Peña Abrego,* Dr. Armando Rosales Torres,**
Dr. Norberto Naal Mendoza,* Dr. Jesús María Rangel Flores,* Dr. Gerardo Sánchez Terrones*

RESUMEN

Los injertos nerviosos son un arma muy útil en la cirugía reconstructiva de las extremidades. Unir dos cabos mediante una interposición nerviosa evita la tensión excesiva sobre los bordes, disminuye la fibrosis y mejora la regeneración nerviosa. El mayor inconveniente de un injerto nervioso es la pérdida de la sensibilidad del área donadora. Realizamos un estudio experimental fase I con ocho conejos macho de la cepa Rex que pesaban entre 900 y 1,200 g cada uno. Dividimos la población en dos grupos para que cada uno incluyera una pierna del conejo. El grupo A de control con injerto de nervio ciático y el grupo B con injerto venoso relleno de plasma rico en plaquetas. Despues de ocho semanas sacrificamos a los conejos y se analizaron las muestras con tinciones de hematoxilina-eosina y luxol fast blue. Siete de las ocho muestras del grupo A y del grupo B presentaron crecimiento axonal con presencia de neuroma proximal; sin embargo, el neuroma proximal en el grupo B fue de menor tamaño. Todas las muestras presentaron desmielinización al observarse con la tinción de luxol fast blue. Concluimos que los injertos nerviosos pueden ser remplazados por injertos venosos con plasma rico en plaquetas para disminuir la morbilidad del área donadora en algunos casos.

Palabras clave: Injerto nervioso, plasma rico en plaquetas, neurorrafia.

SUMMARY

Nerve grafts are a very useful weapon in reconstructive surgery of extremities. Joining two ends through a nerve interposition prevents excessive tension on the edges, reduces fibrosis and improves nerve regeneration. The major drawback of a nerve graft is the loss of feeling of the donor area. We carried out a pilot study phase I with eight male rabbits, strain Rex, weighing between 900 and 1,200 g each. We divided the population into two groups so that each included a rabbit leg. Group A was the control group with a sciatic nerve graft, and group B, the control group with a venous graft stuffed with platelet-rich plasma. After eight weeks we sacrificed the rabbits and analyzed the samples with hematoxylin-eosin and Luxol fast blue tinctures. Seven of eight samples of group A and group B showed the presence of proximal axonal neuroma growth; however, the proximal neuroma in group B was smaller. All samples displayed demyelination observed with Luxol fast blue staining. We concluded that in some cases the nerve grafts can be replaced by vein grafts with platelet-rich plasma to reduce morbidity of the donor area.

Key words: Nerve graft, platelet-rich plasma, neurorrhaphy.

* Departamento de Cirugía Plástica y Microcirugía. Unidad Médica de Alta Especialidad Núm. 21 IMSS, Monterrey N.L.

** Unidad Médica de Neurocirugía. Hospital Star Médica, Zacatecas. Unidad Médica de Alta Especialidad Núm. 21 IMSS, Monterrey N.L.

ANTECEDENTES

Las lesiones del nervio periférico son un problema laboral muy común en nuestro medio; éstas pueden variar desde una simple neuropraxia por un túnel del carpo hasta una sección completa por algún accidente laboral. Desde hace muchos años han sido descritas diversas técnicas de sutura para reparar un nervio periférico seccionado; las más comunes son la epineurial, fascicular y epifascicular.

Diversos estudios han demostrado un beneficio superior con la sutura epineurial en contraste con la fascicular, debido a que la manipulación directa sobre los fascículos forma más cicatrices que la manipulación epineurial.^{1,2}

A pesar de una buena técnica de neurorrafia, la tensión en los cabos anastomosados es uno de los factores predisponentes para la formación de cicatriz, la cual está muy relacionada con el fracaso del procedimiento; por lo tanto, entre mayor tensión de la neurorrafia, mayor formación de tejido fibroso. Se han descrito diversas técnicas de injertos nerviosos e interposiciones con materiales aloplásticos para disminuir la tensión de la reparación nerviosa. Frykman y Gramyk han sido de los pioneros en utilizar injertos nerviosos en reconstrucción de extremidad superior. Gluck en 1980^{2,3} fue el primero en utilizar tubos de silicón para la reparación nerviosa.

Asimismo, muchos factores de crecimiento se han utilizado como coadyuvantes en las reparaciones nerviosas,⁴⁻⁶ como el factor de crecimiento similar a la insulina (IGF), el factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF), el factor de crecimiento derivado de fibroblastos (FGF), el ácido valproico y el gel de colágena.

El plasma rico en plaquetas (PRP) es producido por la sangre autóloga y se ha utilizado ampliamente en cirugía plástica para el manejo de heridas. Se ha demostrado que el PRP contiene aproximadamente de 3 a 8 veces más plaquetas que la sangre pura; su activación está asociada con la liberación de factores de crecimiento derivados de plaquetas, con los factores transformadores del crecimiento (TGF-B), y con el factor plaquetario 4, los cuales estimulan la proliferación y diferenciación con la consiguiente formación de tejido, así como la diferenciación de miofibroblastos que contribuyen a la contracción de la herida.⁷⁻¹⁰

También se ha reportado que el plasma rico en plaquetas estimula la angiogénesis. El efecto angiogénico conduce a la proliferación de nuevos capilares provocada por los factores antes mencionados y por otros, como el factor angiogénico derivado de plaquetas (PDAFs), el factor de crecimiento vascular endotelial

(VEGF), el factor de crecimiento epidérmico (EGF) y el factor de crecimiento endotelial derivado de plaquetas (PDGF).¹¹⁻¹⁴

Este trabajo tiene como objetivo corroborar la utilidad de los injertos de vena llenos de plasma rico en plaquetas comparados con los injertos nerviosos en secciones de nervio ciático en conejos.

MATERIAL Y MÉTODO

Se realizó un estudio experimental fase I en conejos macho de la cepa Rex que pesaban entre 900 y 1,200 g cada uno. Previa asepsia, antisepsia y tricotomía de la región crural posterior, los conejos fueron sedados utilizando una dilución de dos anestésicos: 100 mg de ketamina más 10 mg de diazepam diluidos en solución fisiológica al 0.9% hasta completar 10 mL. La dosis utilizada de ketamina fue de 10 mg/kg y de diacepam fue de 1 mg/kg administrada en forma intraperitoneal con una aguja 25 G. En caso de presentar movimientos o datos de dolor, se administró 1 mL adicional de dicha dilución.

Se realizó una incisión con una hoja de bisturí del número 15 en la superficie medial del muslo en forma bilateral; el nervio ciático se expuso disecando los músculos aductores (*Figura 1*). Despues, bajo visión directa con magnificación (microscopio Opmi-Neuro NC4 de Carl Zeiss, 10X) en el lado derecho de cada conejo se tomó una muestra de nervio ciático de 1 cm y se colocó *in situ* en forma de injerto nervioso, realizando una neurorrafia epineurial con nylon 9-0, puntos simples.

Se tomó una muestra de 1 cm del nervio ciático del lado izquierdo, el cual fue desecharido. Posteriormente se tomó 1 cm de vena femoral ipsilateral y se llenó con plasma rico en plaquetas (*Figura 2*), (ver técnica de extracción), colocando 5 puntos epineuriales a la vena y aplicando el PRP intraluminal con una jeringa de 0.1 mL con aguja 25 G; posteriormente se colocó el sexto y último punto epineural-vena con nylon 9-0 para completar la brecha correspondiente al área de nervio resecado. Al final se suturó la piel con nylon 4-0, puntos continuos.

Después de cuatro semanas se sacrificó a cada conejo con pentobarbital sódico intracardíaco (Anestesal, Pfizer®, 120 mg/kg peso corporal) y se enviaron las muestras de ambas piernas a un estudio histopatológico para tinción con hematoxilina-eosina y azul luxol rápido (luxol fast blue).

Técnica de extracción del plasma rico en plaquetas (PRP)

Para obtener el plasma rico en plaquetas se utilizó una técnica estandarizada en la cual se tomaron

3 mL de sangre conseguida mediante una punción cardiaca directa con aguja 25 G; la sangre se colocó en tubos con citrato sódico al 10% como anticoagulante y posteriormente fue centrifugada a 3,200 revoluciones por minuto durante 3 minutos a 22 grados centígrados (Kitlab®). Al final de la centrifugación se recolectaron los tubos de ensayo y se retiró la capa superficial de su contenido con una pipeta. Posteriormente se aspiró la porción media y se depositó en otro tubo. Ésta es la parte del plasma rico en plaquetas y factores de crecimiento (PDGFs, TGF-B, PDAFs, VEGF, EGF, PDGF). La porción inferior corresponde a glóbulos blancos y eritrocitos, misma que se desechará.

Para que los factores de crecimiento fueran liberados, se activó a las plaquetas mediante la adición de cloruro de calcio al preparado en relación 1:1. Posteriormente se dejó reposar la muestra a temperatura ambiente, de lo que se obtuvo un gel, mismo que se recolectó con una jeringa de 0.1 mL y se aplicó dentro del injerto de vena con la técnica descrita previamente.

Para el análisis estadístico se dividió a la población en los siguientes dos grupos:

Grupo 1. Pierna derecha de cada conejo, en la cual se realizó neurorrafia directa ($n = 8$).

Grupo 2. Pierna izquierda de cada conejo, en la cual se realizó injerto de vena relleno de plasma rico en plaquetas ($n = 8$).

Las muestras se enviaron a examen histopatológico. La tinción de azul luxol rápido indica la presencia de mielina, que muestra en forma indirecta el creci-

miento axonal, tomándose en cuenta la presencia de la misma como un resultado positivo y su ausencia como negativo.

Se tomó la variable de crecimiento positivo y negativo como cualitativa nominal dicotómica y se comparó mediante una prueba exacta de Fisher. A la variable cuantitativa de peso se le calcularon medidas de tendencia central y dispersión. En nuestro hospital no contamos con técnicas de rastreo anterógrado axonal para la medición cuantitativa del crecimiento neuronal, por lo que no se realizó dicho procedimiento. Para el análisis estadístico se utilizó el programa SPSS 10.0 para Windows. Se tomó como significativa una $p \leq 0.05$.

Los animales fueron tratados de acuerdo con los estándares internacionales de manejo de animales de laboratorio.¹⁵ El procedimiento fue aprobado por los Comités de Ética e Investigación de la Unidad Médica de Alta Especialidad Núm. 21 del IMSS en Monterrey, Nuevo León.

RESULTADOS

Se tomaron biopsias de ambas extremidades inferiores (derecha e izquierda) de todos los conejos para completar 16 en total. El peso promedio de los conejos fue de $1,075 \text{ g} \pm 103$, con límite superior de 1,200 g e inferior de 900 g. Se analizaron los reportes de patología tomados cuatro semanas después de la cirugía inicial. Siete de las ocho muestras de los nervios del grupo 1 y siete de las del grupo 2 presentaron crecimiento axonal demostrado mediante estudio histopatológico con tinción de hematoxilina-eosina y luxol

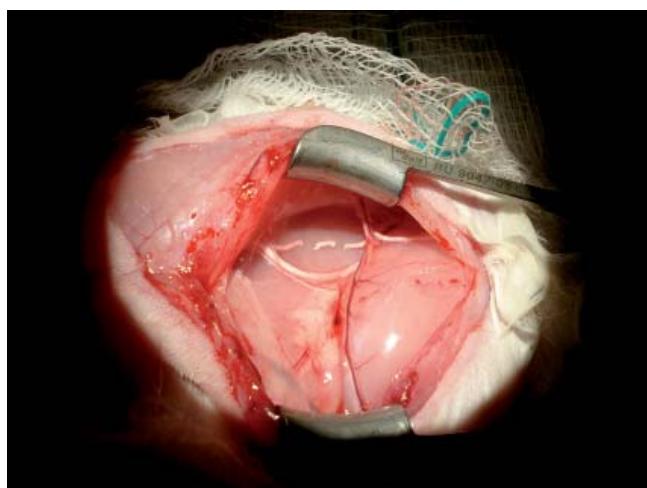


Figura 1. Nervio ciático seccionado.

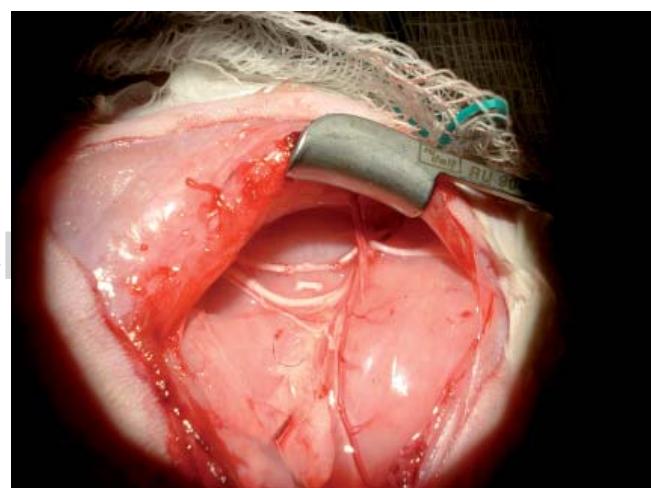


Figura 2. Injerto de vena relleno de plasma rico en plaquetas suturado a los extremos del nervio ciático seccionado.

fast blue (Figuras 3 y 4). No se encontró diferencia estadísticamente significativa en el crecimiento axonal entre ambos grupos, con $p = 0.76$ (RR: 1.0; IC 95%, 0.6905-1.448). Asimismo, se observó desmielinización en todas las muestras. Todas las muestras analizadas presentaron reacción granulomatosa relacionada al material de sutura en la tinción con HE.

Todas las muestras en ambos grupos presentaron neuroma proximal, sin embargo, en el grupo control (grupo 1) fue más notorio que en el grupo de estudio (grupo 2). No se realizó cuantificación de este último.

DISCUSIÓN

La lesión del nervio periférico es un tema muy complejo e incluye numerosos factores que pueden interferir o estimular el crecimiento axonal. Se ha comprobado que la misma lesión neuronal estimula la producción de factores de crecimiento destinados a estimular la regeneración nerviosa.

En nuestro hospital, las lesiones por amputación de una extremidad o un dedo que requieren reimplante con neurorrafia son comunes.¹⁶ Se han reportado diversas técnicas para realizar una neurorrafia, las cuales varían desde puntos simples epineuriales hasta puntos fasciculares.

En nuestra investigación, los resultados tanto en el grupo de estudio como en el grupo control fueron satisfactorios, con un éxito del 87.5% para ambos grupos, mostrando un crecimiento neuronal mediante tinción específica para mielina (*luxol fast blue*). Asimismo, a pesar de mostrar crecimiento neuronal, también se observó desmielinización en todas las muestras debido a que este proceso se completa a los seis meses de la neurorrafia y nuestros conejos se analizaron al mes. No se encontró diferencia es-

tadística significativa entre ambos grupos ($p > 0.05$).

La formación de neuroma proximal estuvo presente en ambos grupos; sin embargo, en el grupo de estudio fue menos notorio macroscópicamente que en el grupo control. Esta diferencia se puede deber a que al colocar la vena sobre el epineuro –imitando un «teléscopio»–, la unión resultante es totalmente hermética, a diferencia de una neurorrafia convencional en donde los puntos pueden formar ventanas estrechas intermedias que sirven de escape a algún fascículo, además de que en este sitio de unión la formación de cicatriz es inevitable.

En una sección convencional, la sangre extravasada y los macrófagos tisulares comienzan a estimular la cascada de inflamación. Estos últimos, junto con la estimulación que produce la ausencia de contacto neuronal, liberan factores de crecimiento y citocinas que estimulan las células de Schwann y la proliferación de fibroblastos, produciendo moléculas de adhesión y factores de crecimiento.^{2,4} Así pues, la adición de plasma rico en plaquetas trata de imitar el ambiente fisiológico de la respuesta normal a la lesión nerviosa, liberando los factores de crecimiento antes mencionados, pero con el objetivo de incrementar y acelerar dicho proceso. En este caso, la adición de los factores de crecimiento fue inmediatamente después a la lesión nerviosa. En condiciones normales la regeneración axonal comienza hasta 2 a 3 días después de la lesión. Esto se debe a que el tiempo necesario para comenzar la migración de macrófagos a través de la barrera hematonerviosa es precisamente 2 a 3 días. En los conejos estudiados añadimos estos factores inmediatamente, adelantando así el proceso de regeneración nerviosa.

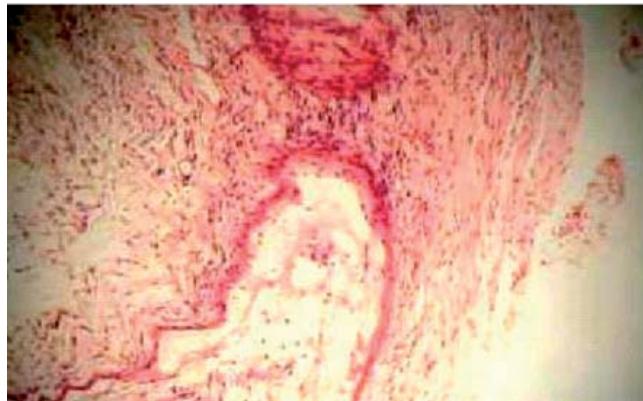


Figura 3. Corte de injerto venoso un mes después de la cirugía. Se observa crecimiento axonal y la pared venosa.

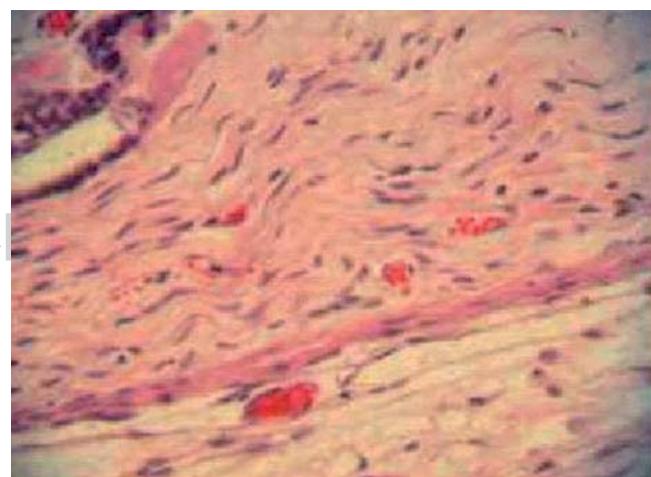


Figura 4. Corte de injerto nervioso in situ. Se observa también crecimiento axonal y tejido conectivo.

No cabe duda que este proceso es muy complejo y que dentro de esta complejidad se encuentran los factores de crecimiento que estimulan a las células de Schwann proximales a la lesión para poder proliferar. El plasma rico en plaquetas proporciona múltiples factores de crecimiento, entre los que se encuentran el factor de crecimiento transformante B (TGF-B), factor plaquetario 4, interleucina 1, factor angiogénico derivado de las plaquetas (PDAF), factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), factor de crecimiento epidérmico (EGF), factor de crecimiento endotelial derivado de las plaquetas (PDGF), factor de crecimiento celular epitelial (ECGF), factor de crecimiento tipo insulina (IGF), osteocalcina, osteonectina, fibrinógeno y trombospondina.¹¹⁻¹⁴

También contiene tres proteínas (fibrina, fibronectina y vitronecrina) que actúan como moléculas de adhesión celular en la osteoconducción, en el tejido conectivo y en migración epitelial.

El plasma rico en plaquetas se obtiene mediante un método muy sencillo y rápido a partir de la sangre del mismo paciente en el mismo quirófano y al momento de la cirugía de reparación nerviosa, por lo que se trata de un método totalmente reproducible y aplicable a cualquier reparación nerviosa. Existen estudios donde los injertos venosos largos se pueden colapsar por la fibrosis y las estructuras adyacentes; sin embargo, estudios posteriores muestran que en los injertos venosos llenos no sucede este fenómeno.¹⁰

En nuestro estudio son dos los factores que intervienen en los resultados: el primero es el injerto de vena y el segundo el plasma rico en plaquetas. En conjunto, el resultado del crecimiento axonal es equiparable al de una neurorrafia convencional ($p > 0.05$); sin embargo, no es posible diferenciar cuál de los dos tiene mayor influencia en este proceso, por lo que otro tipo de estudios se deben realizar con esta finalidad.

CONCLUSIONES

La colocación de injertos venosos llenos de plasma rico en plaquetas en una brecha nerviosa estimula satisfactoriamente la regeneración neuronal y el crecimiento nervioso. La calidad de crecimiento es similar a una neurorrafia convencional. La formación de neuroma es más común en el injerto nervioso que en el venoso en los conejos estudiados.

La principal ventaja en este estudio fue comprobar que el injerto venoso relleno de plasma rico en plaquetas puede sustituir totalmente a un injerto nervioso, presentando un crecimiento axonal similar sin la morbilidad que este último presenta: anestesia de la zona inervada por el nervio donador.

REFERENCIAS

1. Grabb WC, Bement SL, Koepke GH, Green RA. Comparison of methods of peripheral nerve suturing in monkeys. *Plast Reconstr Surg* 1970; 46: 31.
2. Frykman GK, Gramyk K. Results of nerve grafting. In: Gelberman RH. *Operative nerve repair and reconstruction*. Philadelphia: JB Lippincott; 1991: pp. 553-567.
3. Gluck T. Überneoplastik auf dem wege der trasplantation. *Arch Klin Chir* 1980; 26:606-616.
4. Fei W, Xing D, Peng Z, Rao T. Enhanced rat sciatic nerve regeneration through silicon tubes implanted with valproic acid. *J Reconstr Microsurg* 2008; 24(4): 267-275.
5. Zhu SH, Choi BH. Nerve repair using a vein graft filled with collagen gel. *J Reconstr Microsurg* 2005; 21(4): 267-272.
6. Choi BH, Zhu SJ, Kim SH, Kim BY, Huh JH, Lee SH et al. Nerve repair using a vein graft filled with collagen gel. *J Reconstr Microsurg* 2005; 21(4): 267-272.
7. Marx RE, Carlson ER, Eichstaedt RM et al. Platelet-rich plasma: Growth factor enhancement for bone grafts. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 1988; 85: 638-646.
8. Kakudo N, Minakata T, Mitsui T et al. Proliferation-promoting effect of platelet-rich plasma on human adipose-derived stem cells and human dermal fibroblast. *Plast Reconstr Surg* 2008; 122: 1352-1360.
9. Zimmermann R, Jakubietz R, Jakubietz M. Different preparation methods to obtain platelet components as a source of growth factors for local application. *Transfusion* 2001; 41: 1217-1224.
10. Kishida S, Kakudo N, Suzuki K, Kusumoto K. Effects of platelet-rich plasma on proliferation and myofibroblastic differentiation in human dermal fibroblasts. *Ann Plast Surg* 2013; 71: 219-224.
11. Marx RE. Platelet-rich plasma: Evidence to support its use. *J Oral Maxillofac Surg* 2004; 62: 489-496.
12. Marx RE. Platelet-rich plasma (PRP): What is PRP and what is not PRP? *Implant Dent* 2001; 10: 225-228.
13. Eppley BL, Woodell JE, Higgins J. Platelet quantification and growth factor analysis from platelet-rich plasma: Implications for wound healing. *Plast Reconstr Surg* 2004; 114: 1502-1508.
14. Kim HY, Park JH, Han YS, Kim H. The effect of platelet-rich plasma on flap survival in random extension of an axial pattern flap in rabbits. *Plast Reconstr Surg* 2013; 132(1): 85-92.
15. Official Mexican Norm NOM-062-Z00-1999. Technical specifications for the production, care and use of laboratory animals.
16. De la Parra MM, Naal MN. Comparación entre los diversos mecanismos de amputación y la incidencia de necrosis digital en reimplantes. *Cir Plast* 2012; 22(3): 139-145.

Dirección para correspondencia:

Dr. Miguel de la Parra Márquez
 Av. Hidalgo 2480 Pte. Colonia Obispado, Cens 212
 64060 Monterrey, N.L.
 E-mail: drdelaparra@yahoo.com.mx