

# Revista Mexicana de Pediatría

Volumen  
Volume **70**

Número  
Number **1**

Enero-Febrero  
January-February **2003**

*Artículo:*

## Efecto de la administración directa de ácido hialurónico en la regeneración de un nervio periférico seccionado

Derechos reservados, Copyright © 2003:  
Sociedad Mexicana de Pediatría, AC

### Otras secciones de este sitio:

- ☞ Índice de este número
- ☞ Más revistas
- ☞ Búsqueda

### *Others sections in this web site:*

- ☞ *Contents of this number*
- ☞ *More journals*
- ☞ *Search*



**Edigraphic.com**

# Efecto de la administración directa de ácido hialurónico en la regeneración de un nervio periférico seccionado

(Effect of the direct administration of hyaluronic acid in the regeneration of a sectioned peripheral nerve)

Arturo Silva Cuevas,\* Rosa E Soriano Rosales,\* Beatriz E Pérez Guillé,\* Gloria Sicilia Argumedo,\*\* Rosa Ma. Vigueras Villaseñor,\*\* Gabriela Reyes Torres\*\*<sup>1</sup>

## RESUMEN

Estudios previos han demostrado el restablecimiento de la función del nervio ciático seccionado mediante la aplicación de factores de crecimiento nervioso, que aumentan el número de conexiones axonales y el grosor de su mielina. El objetivo de este trabajo fue evaluar la regeneración del nervio ciático seccionado y el restablecimiento de la función nerviosa, mediante la aplicación directa de ácido hialurónico. Se utilizaron 45 ratas Wistar de 250-300 g de peso. Se formaron 3 grupos de 15 animales cada uno. El grupo 1 se utilizó como control sano, a los grupos 2 y 3 se les realizó sección del nervio ciático, al grupo 2 se le administró en el sitio de la plastia solución salina fisiológica y al 3 directamente ácido hialurónico al 20%. A todos los grupos se les practicaron pruebas de marcha a las 5 semanas, en el grupo 1 se encontró diferencia en: sensibilidad, movimiento de tarso, apertura de los dedos y prensión comparado con los grupos 2 y 3. El análisis histológico mostró en los animales del grupo 3 un mayor número de axones conectados comparado con el grupo 2. Consideramos que el uso de ácido hialurónico inyectado en forma directa mejora el proceso de regeneración del nervio ciático seccionado en la rata.

**Palabras clave:** Ácido hialurónico, regeneración, neural.

## SUMMARY

Previous studies have shown the re-establishment of the function of a sectioned sciatic nerve by the application of nerve growth factors that increase the number of axonal connections and the thickness of the myelin sheath. The aim of this study was to assess the regeneration of the sectioned sciatic nerve and its function by the direct application of hyaluronic acid. A total of 45 Wistar rats weighing 250-300 g were used and divided into three groups of 15 rats each. Group 1 was used as the healthy control group, group 2 was administered physiologic saline solution at the plasty site and group 3 received 20% hyaluronic acid on the sectioned area. All groups were subjected to gait tests at 5 weeks. Group 1 showed differences in: sensitivity, tarsal movement, finger opening and grasping compared to groups 2 and 3. The histologic analysis showed that the animals in group 3 had a greater number of axons connected compared with group 2. We believe the direct use of injected hyaluronic acid improves the regeneration process of the sectioned sciatic nerve in the rat.

**Key words:** Hyaluronic acid, neural, regeneration.

## INTRODUCCIÓN

El proceso de cicatrización de un nervio periférico seccionado interfiere en el sitio de reparación de la regeneración axonal, por la presencia de fibrosis y células inflamatorias. Experimentalmente se han utilizado algunas sustancias que mejoran este proceso, disminuyendo la fibrosis y la infiltración leucocitaria; Kontoleon y col. en 1985,<sup>1</sup> con el empleo

<sup>1</sup> Torre de Investigación "Dr. Joaquín Cravioto".  
Instituto Nacional de Pediatría.

\* Laboratorio de Cirugía Experimental.  
\*\* Laboratorio de Histomorfología.

de la hormona de crecimiento y triyodotironina, reportaron un aumento en la velocidad de regeneración del nervio ciático cuando éste fue lesionado por compresión. En un trabajo similar con ratas hipofisectomizadas, Kanje y cols.<sup>2</sup> encontraron aumento en la velocidad de regeneración de un nervio lesionado, al aplicar hormona de crecimiento. Por otro lado, con oxígeno hiperbárico Zamboni y col.<sup>3</sup> observaron mejoría funcional de un nervio seccionado, pero un año después, Santos y cols.<sup>4</sup> no encontraron ninguna mejoría empleando el mismo tratamiento. Kanje y cols.,<sup>5</sup> reportaron inhibición del proceso de regeneración de los cabos en el nervio seccionado al utilizar drogas inhibidoras del crecimiento celular como vinblastina y mitomicina. En otros estudios de sección del nervio se ha demostrado regeneración de los axones de las neuronas ganglionares y el restablecimiento de su función, mediante la aplicación de factores de crecimiento nervioso, que aumentan el número de axones conectados y el grosor de su mielina. También se les ha atribuido un papel benéfico en la regeneración axonal a la matriz de fibrina, laminina, testosterona, gangliósidos GM-1, catalasa y al factor de crecimiento acidófilo de fibroblastos.<sup>6</sup> En estudios sobre el proceso de cicatrización fetal se ha encontrado que ésta se realiza sin infiltración celular y sin fibrosis, participando el ácido hialurónico que es un aminoglicano que se encuentra en alta concentración en la matriz intercelular; éste provoca una alta hidratación que abre espacios a la movilidad de las células inflamatorias y a los fibroblastos, los cuales además forman una capa de receptores aniónicos que atraen los factores catiónicos de crecimiento necesarios para la cicatrización, inhibiendo simultáneamente la diferenciación celular.<sup>7-10</sup> Seckel y cols.,<sup>6</sup> en un estudio realizado en ratas inyectaron ácido hialurónico alrededor de un nervio periférico seccionado a través de una guía y observaron que la regeneración nerviosa tenía mejor velocidad de conducción, debido a un aumento en el número de axones conectados y mielinizados.

Este trabajo propone la administración directa del ácido hialurónico en el sitio de sección del nervio periférico, sin guías u otros aditamentos que pudieran interferir en su regeneración, producir una infección local o un proceso inflamatorio de rechazo a cuerpo extraño, ya que deben mantenerse más de una semana y que además tendrán que ser extraídas posteriormente como en los estudios realizados por Seckel<sup>6</sup> y Sawai.<sup>10</sup>

## MATERIAL Y MÉTODOS

Se utilizaron 45 ratas Wistar de 250-300 g de peso, mantenidas en condiciones estándar de bioterio con ciclo luz-oscuridad de 12-12 h, con alimento y agua a libre acceso. Este trabajo fue previamente aprobado por el

Comité Institucional para el Cuidado y uso de Animales de Laboratorio (CICUAL) de acuerdo a la Norma Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999, Diario Oficial, 22 agosto de 2001. Todos los animales fueron sometidos a anestesia general con una combinación de ketamina 35mg/kg más xilacina 3 mg/kg y atropina 0.05 mg/kg por vía intramuscular. Se les practicó una incisión en la región del miembro pélvico izquierdo, cortando o separando aponeurosis y músculo glúteo para descubrir el tronco del nervio ciático y seccionarlo.

Se formaron 3 grupos de 15 animales cada uno: el grupo 1 se utilizó como control sano, el grupo 2 (solución salina) considerado como control del grupo experimental, se le realizó sección del nervio ciático, posteriormente se colocó en cada extremo un punto con seda 7 ceros introduciéndolos en un tubo de silicona de 3 mm y calibre 16 ó 18 Fr perforado en su parte media, por donde se extrajeron los puntos de seda, quedando afrontado dentro del tubo la unión del nervio, finalmente se aplicó mediante inyecciones directas en la zona de la plastia solución salina fisiológica cada 12 horas en cantidad de 0.2 a 0.3 mL, durante 15 días y el grupo 3 (ácido hialurónico) fue semejante al grupo 2 pero la solución inyectada fue de ácido hialurónico al 20% cada 12 horas durante 15 días, periodo en el cual señala Wagner<sup>11</sup> aumentó el diámetro de los axones dañados. Después de 5 semanas a todos los grupos se les practicaron pruebas de marcha a fin de evaluar la elevación de la pata afectada; si su pie era plano o en garra, la sensibilidad, la movilidad del tarso, la apertura de los dedos al estimular la planta del pie con punción, y el reflejo de prensión.

Todos los animales se sacrificaron con sobredosis de anestesia, usando para ello pentobarbital sódico. Se obtuvieron muestras del nervio ciático en el sitio de sección y se fijaron en formol al 10% en buffer de fosfatos durante 15 días. Los tejidos fueron procesados para su inclusión en parafina, y a la mitad de las muestras por grupo se les practicó cortes transversales y a la otra mitad longitudinales de 5 μ de grosor.

Se obtuvieron 4 laminillas con tres cortes en cada uno y se tiñeron con las siguientes técnicas: hematoxilina-eosina, para obtener una visión general del tejido; tricrómica de Masson, para evidenciar las fibras de colágeno; método de Klüver Barrera, para observar las fibras nerviosas mielinizadas; doble impregnación argéntica (variante de Barroso Moguel), para mostrar el grado de integridad de las fibras nerviosas.

Se evaluaron los cortes mediante un análisis semi-quantitativo considerando la continuidad del nervio, el grado de cicatrización, inflamación, presencia de hemorragia, angiogénesis y necrosis. Estos parámetros fueron definidos empleando una escala de 0 a 3 en base a la ausencia, ligera, moderada o excesiva expresión de éstos,

**Cuadro 1.** Resultados de la prueba de marcha a que se sometieron los tres grupos de ratas, cinco semanas después.

Grupo	Sensibilidad		Pie		Mueve tarso		Abre dedos		Prensión	
	Sí	No	Plano	Garra	Sí	No	Sí	No	Sí	No
1	15	0	15	0	15	0	15	0	15	0
2	7	8 <sup>a</sup>	10	5 <sup>a</sup>	1	14 <sup>a</sup>	0	15 <sup>a</sup>	0	15 <sup>a</sup>
3	15	0 <sup>b</sup>	13	2	15	0 <sup>b</sup>	14	1 <sup>b</sup>	14	1 <sup>b</sup>

<sup>a</sup> Comparación grupo 1 vs 2 p < 0.05<sup>b</sup> Comparación grupo 2 vs 3 p < 0.05

respectivamente. El diámetro del axón se determinó empleando una rejilla ocular bajo el objetivo de 100X. La densidad de axones se determinó contando el número de éstos contenidos en un área de 500  $\mu^2$  bajo el objetivo de 100X.

Procesamiento de las muestras para microscopía electrónica: El nervio ciático de 3 ratas de los grupos 2 y 3 fue removido, seccionado y fijado en solución de Karnovsky modificado. Posteriormente se lavó en solución amortiguadora de cacodilatos 0.1M y se posfijó en solución 1% de tetróxido de osmio durante 1 h. Al término de éste, las muestras se lavaron con agua destilada y se deshidrataron con alcoholes graduales, posteriormente se pasaron a óxido de propileno durante 20 minutos. Finalmente las muestras fueron impregnadas e incluidas en EPON.

Se realizaron cortes finos, los cuales fueron montados en rejillas de cobre y contrastados con acetato de uranilo y nitrato de plomo. Fueron analizados en un microscopio electrónico EM-10 (Carl Zeiss) obteniéndose placas fotográficas.

Los resultados de la marcha y sensibilidad se analizaron mediante la prueba de Ji cuadrada. Para los datos cuantitativos se usó la prueba de ANOVA de una vía, y

de Tukey; y los datos cualitativos fueron analizados con la prueba de Kruskall-Wallis, considerando un nivel de significativa de 0.05. Los resultados fueron resumidos con la media aritmética y la dispersión corresponde al error estándar.

## RESULTADOS

En el grupo 3 (ácido hialurónico), se encontró una diferencia estadísticamente significativa en las pruebas de sensibilidad, movimiento de tarso, apertura de dedos y prensión comparado con su grupo control 2 (p < 0.05) (*Cuadro 1*).

El análisis histológico de los animales tratados con ácido hialurónico (grupo 3) mostró una mayor continuidad de los nervios al compararse con el grupo con solución salina (grupo 2) (p < 0.05) (*Figuras 1, 2 y 3*).

Hubo una disminución significativa (p < 0.05) en la hemorragia y la angiogénesis e incremento significativo (p < 0.05) del número de axones en un área de 500  $\mu^2$ , en los nervios de animales con administración de ácido hialurónico, al compararse con los animales sin administración de ácido hialurónico. Aunque estos parámetros fueron menores al grupo control (grupo 2).

**Cuadro 2.** Resultados histológicos observados en los tres grupos de ratas.

Grupo	Continuidad del nervio	Contenido de fibras de colágena	Hemorragia	Angiogénesis	Leucocitos y macrófagos	Necrosis	Diámetro del axón con mielina ( $\mu$ )	Número de axones en un área de 500 $\mu^2$
Grupo 1 (Control sano)	3 ± 0.0	0 ± 0.0	0 ± 0.0	0 ± 0.0	0 ± 0.0	0 ± 0.0	7.04 ± 1.2	69.1 ± 6.3
Grupo 2 (Seccionado)	1.09 ± 0.30*	2.73 ± 0.47*	2.36 ± 0.67*	0.90 ± 0.32*	1.91 ± 0.83*	1.00 ± 0.0*	5.13 ± 1.1*	16.0 ± 2.5*
Grupo 3 (Sección + hialurónico)	1.85 ± 0.37*,**	2.70 ± 0.47*	2.50 ± 0.61*,**	1.32 ± 0.58*,**	2.00 ± .65*	1.00 ± 0.0*	5.12 ± 1.1*	48.7 ± 3.6*,**

\* p &lt; 0.05 respecto al grupo 1

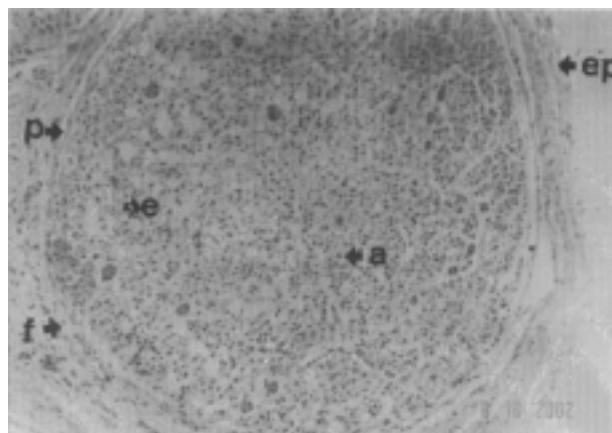
\*\* p &lt; 0.05 respecto al grupo 2

Los resultados son expresados como  $\bar{X} \pm S$ .

Los datos cualitativos, se usó la prueba de Kruskall-Wallis y los cuantitativos con la prueba ANOVA de una vía, y Tukey.

El resto de las variables analizadas, es decir el contenido de las fibras de colágeno, la presencia de leucocitos y macrófagos, la necrosis y el diámetro axonal no presentaron diferencia significativa entre los grupos ( $p > 0.05$ ); pero los grupos 2 y 3 fueron diferentes al compararse con el grupo 1 ( $p < 0.05$ ) (Cuadro 2).

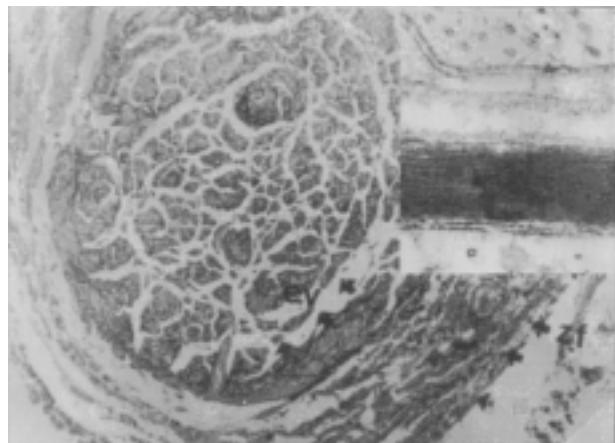
Por microscopía electrónica se pudo apreciar que los axones de los animales pertenecientes al grupo con solución salina (grupo 2) mostraron distintos grados de desmielinización (Figura 2) y en el perineuro se observó gran cantidad de fibroblastos y células inflamatorias. Respecto al grupo tratado con ácido hialurónico (grupo 3) se presentó



**Figura 1.** Corte transversal de nervio ciático normal (grupo 1) donde se observa un fascículo (f) del nervio normal, el perineuro (p), epineuro (ep) y endoneuro (e), dentro del endoneuro se observan gran cantidad de axones (a) (hematoxilina-eosina).



**Figura 2.** Corte transversal de nervio ciático del grupo control (grupo 2), se observan zonas grandes de fibrosis (ZF) y zonas sin tejido (ev), se aprecia una menor densidad de axones (hematoxilina-eosina 6X). El recuadro corresponde a una micrografía electrónica de un axón en donde se aprecia una clara desmielinización (25,000 X).



**Figura 3.** Corte transversal del nervio ciático del grupo ácido hialurónico (grupo 3) donde se observan pequeñas zonas con fibrosis (ZF), rodeando los hilos de sutura y gran cantidad de axones (Hematoxilina-eosina 6X). El recuadro corresponde a una micrografía electrónica en donde se observa un axón con recuperación en la integridad de la mielina (25,000 X).

poca desmielinización y predominaron áreas en perfectas condiciones; en el perineuro fueron ocasionales la presencia de células inflamatorias.

## DISCUSIÓN

En la actualidad se han incrementado estudios sobre los procesos de cicatrización y regeneración de tejidos dañados incluyendo el óseo y el nervioso. El objetivo de este trabajo fue evaluar la regeneración del nervio ciático seccionado y el restablecimiento de la función nerviosa, a través de la continuidad de axones mielinizados en número y calidad satisfactorios mediante la aplicación directa de ácido hialurónico; de una forma similar Mohammad reporta<sup>19</sup> que utilizando productos biodegradables y una guía para inyectar factor de crecimiento y ácido hialurónico en un nervio periférico seccionado, obtiene un porcentaje mayor del 45% de axones conectados, al compararlos con los de solución salina; de la misma manera los resultados que arrojó el grupo experimental de nuestro trabajo con ácido hialurónico mostraron franca mejoría en la movilidad del tarso y de los dedos con respecto a su grupo control. El estudio histológico reflejó algunas diferencias en el diámetro de los axones ligeramente inferior en el grupo control comparado con el de ácido hialurónico, éste es un hecho que así se reporta en los nervios periféricos que están en proceso de regeneración;<sup>16-18</sup> en la microscopía electrónica se mostró el mismo hecho pero además se observó predominio de áreas en perfectas condiciones cuando fueron tratados con el ácido (Figura 3) lo cual consideramos como recuperación.

ción. Además en un estudio realizado por Collier y Cam<sup>20</sup> observaron un aumento de la angiogénesis, vascularización y de conducción eléctrica en el nervio periférico, al utilizar películas impregnadas con compuestos biológicamente activos de ácido hialurónico y un polímero polipirrólido.

Creemos que una mayor cantidad de ácido hialurónico en la zona afectada, influye para que se presente un mayor número de axones mielinizados reparados, que son los que determinan la recuperación funcional de la contracción muscular indispensable para realizar la marcha que había sido afectada durante la sección del nervio.

En conclusión consideramos que la aplicación directa del ácido hialurónico mejora el proceso de regeneración del nervio ciático seccionado de la rata, por modificar la etapa inicial de la inflamación. Los hallazgos de movilidad de los dedos y del tarso, y los datos histológicos que mostraron un mayor número de axones mielinizados con respecto al control, nos permite suponer que este aminoglicano aplicado en forma directa ayudó a obtener estos resultados, sin la posibilidad de inflamación o reacción de rechazo que provocan aditamentos extraños, como son las guías que utilizan otros autores.<sup>6,19,21</sup>

Cabe mencionar que si se pudiera establecer desde el inicio la aplicación del ácido hialurónico aunada a una rehabilitación continua, estimulando la contracción del músculo paralizado por la sección del nervio, podría mejorarse la función perdida.

## Referencias

- Kontoleon-Vakalopoulou E, Apostolakis M, Bountzioukas S, Stergiou MV. Effects of growth hormone and triiodothyronine administration on the localization of C-Dglucose. *J End Invest* 1985; 8: 121-125.
- Kanje M, Skottner A, Lundborg G. Effects of growth hormone treatment on the regeneration of rat sciatic nerve. *Brain Res* 1988; 475: 254-258.
- Zamboni WA, Brown RE, Roth AC, Mathur A, Stephenson LL. Functional evaluation of peripheral-nerve repair and the effect of hyperbaric oxygen. *J Reconst Microsurg* 1995; 11(1): 27-30.
- Santos PM, Zamboni WA, Williams SL, Covey JF, Kienstra MA. Hyperbaric oxygen treatment after rat peroneal nerve transection and entubulation. *Otolaryng-head and Neck Surg* 1996; 114(3): 424-434.
- Kanje M, Lundborg G, Edström A. A new method for studies of the effects of locally applied drugs on peripheral nerve regeneration *in vivo*. *Brain Res* 1988; 439: 116-121.
- Seckel BR, Jones D, Hekimian KJ, Wang KK, Chakalis DP, Costas PD. Hyaluronic acid through a new injectable nerve guide delivery system enhances peripheral nerve regeneration in the rat. *J Neur Res* 1995; 40: 318-324.
- Mast BA, Haynes JH, Kummel TM, Diegelman RF, Cohen K. In vivo degradation of fetal wound hyaluronic acid results in increased fibroplasia, collagen deposition, and neovascularization. *Plast Reconstr Surg* 1992; 89(3): 503-509.
- Klüver H, Barrera EJ. *Neuropath Exp Neurol* 1953; 12: 400-403.
- Kujawa MJ, Pechak DG, Fiszman MY, Caplan AL. Hyaluronic acid bonded to cell culture surfaces inhibits the program of myogenesis. *Develop Biol* 1986; 113: 10-16.
- Sawai T, Usui N, Sando K, Fukui Y, Kamata S, Okada A, Taniguchi N, Itano N, Kimata K. Hyaluronic acid of wound fluid in adult and fetal rabbits. *J Pediatr Surg* 1997; 32(1): 41-43.
- Wagner R, Deleo JA, Heckman HM, Myers RR. Peripheral nerve pathology following sciatic cryoneurolysis: Relationship to neuropathic behaviors in the rat. *Exp Neurol* 1995; 1335, 256-264.
- Yoneda M, Suzuki S, Kimata K. Hyaluronic acid associated with the surfaces of cultured fibroblasts is linked to a serum-derived 85-kDa protein. *J Biol Chem* 1990; 265(9): 5247-5257.
- Pascoe MK, Silbert PL, Stolp-Smith KA. Stimulus-induced repetitive discharges of long latency: axonal loop reflexes. *Muscle & Nerve* 1995; 18(8): 927-928.
- Coderre TJ, Grimes RW, Melzack R. Deafferentation and chronic pain in animals: an evaluation of evidence suggesting autotomy is related to pain. *Pain* 1986; 26: 61-84.
- DeLeo JA, Coombs DW, Willenbring S, Colburn RW, Fromm C, Wagner R, Twitcchell BB. Characterization of a neuropathic pain model: sciatic cryoneurolysis in the rat. *Pain* 1994; 56: 9-16.
- Politis MJ, Ederle K, Spencer PS. Tropism in nerve regeneration *in vivo*. Attraction of regenerating axons by diffusible factors derived from cells in distal nerve stumps of transected peripheral nerves. *Brain Res* 1982; 253: 1-2.
- Decker M, Chiu ES, Dollbaum C, Moiin A, Hall J, Spendlove R, Longaker MT, Stern R. Hyaluronic acid-stimulation activity in sera from the bovine fetus and from breast cancer patients. *Cancer Res* 1989; 49: 3499-3505.
- Hooker GD, Taylor BM, Facs F, Driman DK. Prevention of adhesion formation with use of sodium hyaluronate-based bioreabsorbable membrane in rat model of ventral hernia repair with polypropylene mesh-A randomized, controlled study. *Surg* 1999; 125(2): 211-216.
- Mohammad JA, Warnke PH, Pan YC. Increased axonal regeneration through a biodegradable amniotic tube nerve conduit: Effect of local delivery and incorporation of nerve growth factor/hyaluronic acid media. *Ann Plast Surg* 2000; 44(1): 59-64.
- Collier JH, Camp JP, Hudson TW. Synthesis and characterization of polypyrole-hyaluronic acid composite biomaterials for tissue engineering applications. *J Biomed Mater Res* 2000; 50(4): 574-84.
- Wang KK, Nemeth IR, Seckel BR. Hyaluronic acid enhances peripheral nerve regeneration *in vivo*. *Microsurgery* 1998; 18(4): 270-5.

### Correspondencia:

Dr. Arturo Silva Cuevas

Torre de Investigación "Dr. Joaquín Cravioto"

Instituto Nacional de Pediatría

Av. del Imán (domicilio conocido)

Tel. 56 52 67 00