

Tratamiento con Ultrasonido Continuo de Alta Intensidad en Nervios Isquiáticos de Rata (Sprague Dawley) Lesionados por Compresión

Treatment with Continuous High-Intensity Ultrasound on Rat Sciatic Nerve (Sprague Dawley) and Compression Injuries

*Emilio Farfán & **Fernando Matamala

FARFÁN, E. & MATAMALA, F. Tratamiento con ultrasonido continuo de alta intensidad en nervios isquiáticos de rata (Sprague Dawley) lesionados por compresión. *Int. J. Morphol.*, 29(3):787-791, 2011.

RESUMEN: Actualmente las patologías compresivas de nervios espinales son de alta incidencia. Como una forma de contribuir con fundamentos morfológicos a la aplicación de ultrasonido terapéutico se realizó la presente experiencia, que se refiere a la reparación de los nervios espinales luego de una injuria compresiva. Para esto se utilizaron 9 ratas Sprague Dawley las cuales fueron separadas en tres grupos con 3 ratas cada uno: A) control sano, B) control lesionado y C) aplicación de ultrasonido terapéutico de 1w/cm². Las ratas de los grupos B y C fueron anestesiadas y se les aisló quirúrgicamente el nervio isquiático, el cual fue pinzado durante 45 segundos con una fuerza constante de 40N. La compresión se realizó a 10mm sobre su bifurcación distal, luego se desinfectó y suturó. 24 horas después de la compresión las ratas del grupo C fueron irradiadas con un equipo de ultrasonido terapéutico, utilizando 1w/cm² de intensidad con frecuencia de 3 MHz y un cabezal de 0,5cm², durante 1 minuto y en 10 días seguidos. 28 días después de la irradiación se extrajeron los nervios isquiáticos y fueron sometidos a técnicas histológicas de rutina con tinción de HE y VG. Se realizó el diagnóstico histopatológico y la morfometría donde se midió: grosor del perineuro, perímetro de los núcleos de neurilemocitos, perímetro del axón mielínico, perímetro de la mielina, ancho del núcleo del fibroblastocito y largo del núcleo del fibroblastocito. Los resultados permiten concluir que el ultrasonido de modalidad continua estimula la regeneración del nervio espinal lesionado por compresión.

PALABRAS CLAVE: Nervio isquiático de rata; Neuropraxia; Ultrasonido terapéutico.

INTRODUCCIÓN

Desde los inicios del ultrasonido se investigó acerca de los efectos de su utilización sobre el cuerpo humano. Rubin (1958) afirmó que los efectos térmicos, mecánicos, químicos y biológicos dependen de la intensidad de la irradiación, pudiendo el ultrasonido aumentar la temperatura de los tejidos blandos (Draper & Ricard, 1995; Chan *et al.*, 1998). Profundizando más, Martínez *et al.* (1998) afirmaron que los efectos biológicos incluyen vasodilatación, incrementos del metabolismo local con estimulación de las funciones celulares y de la capacidad de regeneración tisular favoreciendo el intercambio iónico y mejorando la nutrición celular. En cuanto a la reparación de tejidos, mejora la reabsorción de hematomas (Berná-Serna *et al.*, 2005) dando lugar al fraccionamiento celular, facilitando la fagocitosis durante la inflamación (Demir *et al.*, 2004; De Deyne & Kirsh-Volders, 1995) y permitiendo la proliferación de fibroblastos y su activación en la

secreción de MEC (Material Extra Celular) Schencke & del Sol (2010). Referente a lesiones de nervios, algunos como el nervio isquiático humano a pesar de poseer entre 63 y 70 fascículos (del Sol *et al.*, 2010) igual se ven afectados por compresiones que se clasifican de menor a mayor severidad en Neuropraxia, Axonotmesis y Neurotmesis (Seddon & Herbert, 1975) produciéndose desmielinización. López *et al.* (1990) afirmaron que mientras mayor sea el tiempo de compresión más se acentuarán los fenómenos patológicos y el edema, dificultando la regeneración, lo que aumenta el número y volumen ocupado por los neurilemocitos reforzando su rol como moduladoras en la remielinización preconizado por Chen *et al.* (2007); Rummer & Gupta (2004) y Nieto-Sampedro *et al.* (2003). Luís *et al.* (2007) estandarizaron una técnica consistente en una compresión nerviosa con una pinza graduada en 54 Newton (N) produciendo axonotmesis.

*Programa de Magister en Ciencias, Mención Morfología, Facultad de Medicina, Universidad de La Frontera, Temuco, Chile.

**Morfología, Facultad de Medicina, Universidad de La Frontera, Temuco, Chile.

Como resultados describen la presencia de microfasciculación, de las fibras nerviosas regeneradas, fibras mielínicas con menor calibre y una vaina de mielina más delgada. Lo mismo hecho por Mazzer *et al.* (2008) solo que con mayores fuerzas compresivas (150N) dio como resultado daño en las fibras nerviosas, conservándose las envolturas conjuntivas y las fibras de pequeño diámetro. Histopatológicamente describen conservación del epineuro, con alteración del perineuro y rarefacción del endoneuro. Habash *et al.* (2006) aseveraron que el nervio espinal es una de las estructuras más sensibles a la hipertermia causada por el ultrasonido produciendo éste efectos positivos en su protección y reparación, idea que es reforzada por Monte-Raso *et al.* (2006).

MATERIAL Y MÉTODO

Para el desarrollo de este trabajo que fue autorizado por la Comisión de Bioética de la Facultad de Medicina, se utilizaron como sujetos de experimentación 9 ratas Sprague Dawley de sexo masculino y un peso promedio de 250g, obtenidas del Bioterio de la Facultad de Medicina de la Universidad de la Frontera, Temuco, Chile, todas sanas y alimentadas con pellet e hidratación *ad libitum* en condiciones de ventilación y luminosidad apropiadas y cada una en su jaula individual. Estas fueron separadas en tres grupos con 3 ratas cada uno, las que se agruparon aleatoriamente y fueron clasificadas de la siguiente manera, grupos: A) control sano B) control lesionado, C) aplicación de ultrasonido terapéutico de 1w/cm². Para el experimento se realizaron 5 procedimientos que se describen en detalle más adelante, bajo los conceptos de “compresión nerviosa”, “irradiación”, “eutanasia y disección”, “procedimiento histológico” y “morfometría”. Hay que mencionar que el grupo A (control sano) fue utilizado solo en los procedimientos de eutanasia y disección, procedimiento histológico y morfometría. El grupo B (control lesionado) fue utilizado en la compresión, eutanasia y disección y análisis histológico y morfometría, mientras que el grupo C (aplicación de 1w/cm²) fue utilizado en todos los procedimientos. Para la compresión nerviosa se realizó un procedimiento quirúrgico con anestesia (Ketamina y Xilacina) del espécimen, durante 45 segundos con una pinza construida especialmente para la experiencia, la cual ejerció una fuerza constante de 40N, con el fin de producir una Neuropraxia (Matamala *et al.*, 2010). Este procedimiento se realizó en los grupos B (Control lesionado) y C (aplicación de 1w/cm²). Transcurridas 24 horas postcirugía, se inició la irradiación con ultrasonido continuo (1w/cm²). Para esto se utilizó un equipo de ultrasonidos con modalidad continua, una frecuencia de 3MHz, un cabezal de 0,5cm² y con una intensidad de 1w/cm² durante 10 días consecutivos. Con el objeto de obtener una muestra con menores signos de res-

puesta inflamatoria, se realizó a los 28 días del postoperatorio la tercera etapa, que fue la extracción del nervio isquiático en los 3 grupos, para lo cual se eutanasiaron los animales con exceso de anestesia y se efectuó la misma disección por planos utilizada en la compresión. Una vez ubicado el nervio, éste se cortó en su extremo proximal específicamente en el lugar de emergencia en la región glútea y en su extremo distal antes de la bifurcación. Para el procesamiento histológico de las muestras se hicieron cortes transversales y longitudinales de 5 µm de espesor a los que se les realizaron tinciones de Hematoxilina eosina (HE) y Van Gieson (VG). Una vez hechas las placas histológicas se practicó la medición de las estructuras a través de Morfometría con el microscopio Carl-Zeiss, Axiolab y el software Leica Suite Image Analysis IM1000 donde se midió (tres veces) el perímetro del núcleo de los neurilemocitos, ancho y largo de los núcleos de fibroblastocitos, perímetro de mielina, perímetro del axón mielínico y grosor del perineuro. Dichas mediciones fueron analizadas estadísticamente con el software Stata 10.

RESULTADOS

El segmento de nervio isquiático de rata Sprague Dawley extraído tiene una longitud promedio de 20mm, es de forma cilíndrica y presenta un aplanamiento en la zona de compresión (Fig. 1), se encuentra conformado por aproximadamente 3 a 4 fascículos que se encuentran separados por perineuro y divididos en anteriores y posteriores en relación al eje longitudinal y contenidos todos bajo el epineuro. Resultados grupo A, Control sano: Se observa un fascículo de



estructura normal, en cuyo seno se distribuyen las fibras nerviosas de trayecto ondulante, (fibra con neurilemocitos). A su vez, cada fascículo se encuentra limitado por el perineuro, constituido por capas de células perineurales de origen fibroblástico separadas por fascículos de colágeno. El corte transversal permite observar fibras nerviosas mielínicas con su axón central intensamente teñido (Fig. 2). Resultados grupo B, Control lesionado: A diferencia del nervio control sano se aprecia un estrechamiento cen-

Fig. 1. Nervio isquiático de rata pinzado con una fuerza de 40N durante 45 segundos. La flecha indica el lugar de la compresión (10x).

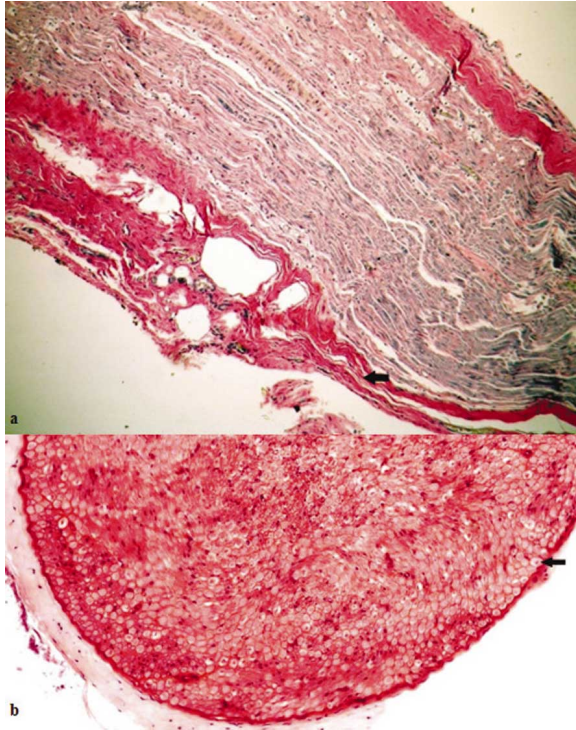


Fig. 2. a) Corte longitudinal de Nervio control sano, se indica la zona de contacto del epineuro con el perineuro. (Van Gieson 100x). b) Corte transversal de Nervio control sano, se indica el espacio que corresponde a la mielina y el axón en su interior. Van Gieson 400x.

tral que compromete a las capas conjuntivas y un foco de fibrosis endoneural con infiltración linfocitaria. El grosor de la vaina es de tamaño variable observándose núcleos de neurilemocitos reactivos levemente agrandados pero normalmente adosados en la periferia de dichas vainas. El axón se observa levemente hiper cromático y de tamaño variable (Fig. 3). Resultados grupo C, con aplicación de Ultrasonido 1 w/cm²: En los cortes observados se identifican focos de fibrosis organizada y a mayor aumento se pueden identificar los núcleos de los neurilemocitos con un marcado aumento de tamaño, cromatina gruesamente organizada, presencia de macronúcleolos y la matriz colágena con haces de fibras gruesas identificadas por tinción de Van Gieson con una proliferación de fibroblastocitos reactivos (Fig. 4).

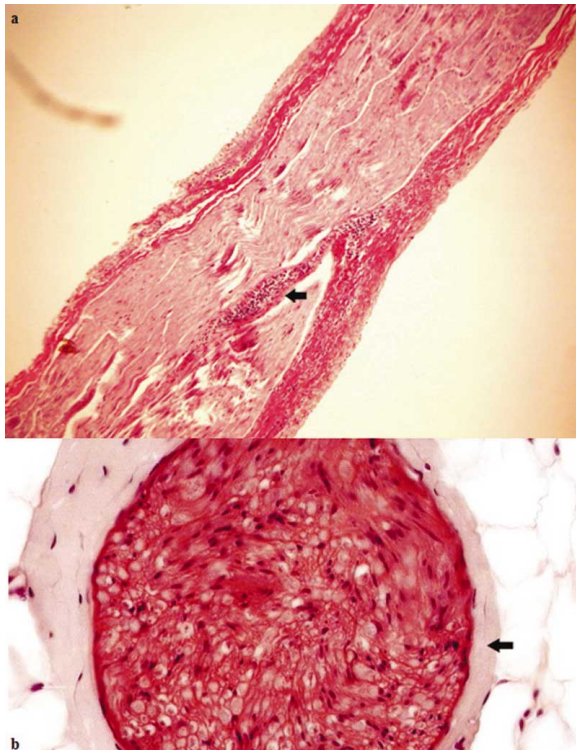


Fig. 3. a) Corte longitudinal de nervio control lesionado, se indica foco de fibrosis con infiltración linfocitaria (Van Gieson 100x).. b) Corte transversal de nervio control lesionado, se indica epineuro rodeando al perineuro. Van Gieson 400x.

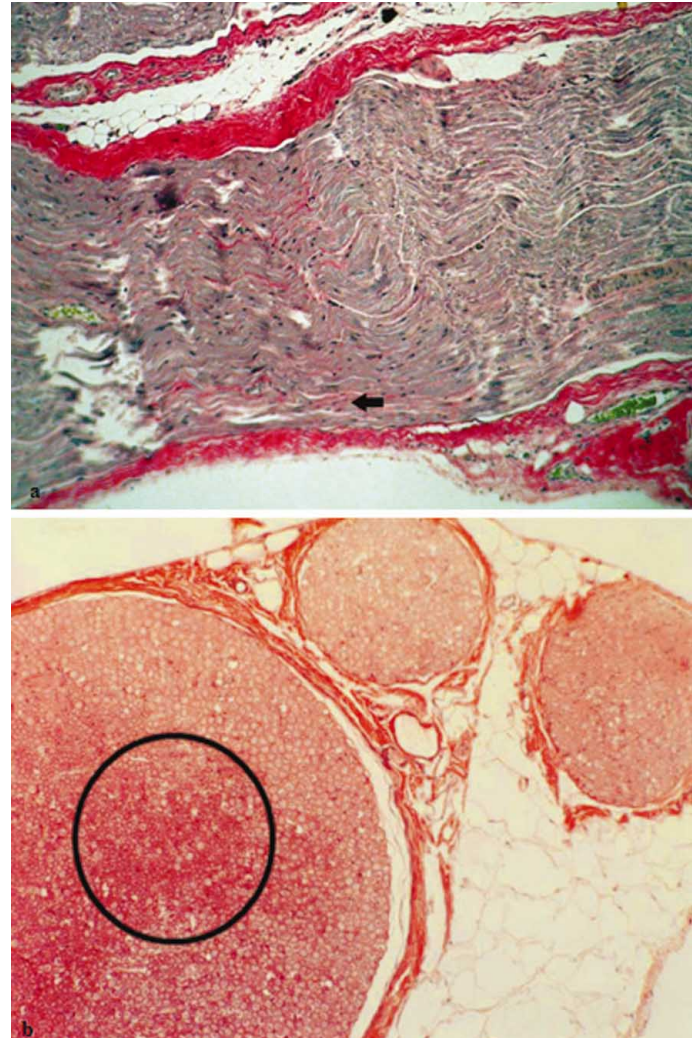


Fig. 4. a) Corte longitudinal de nervio irradiado con 1w/cm² se indica foco de fibrosis endoneural. b) Corte transversal de nervio irradiado con 1w/cm² se encierra en círculo foco de fibrosis endoneural. Van Gieson 100x.

Tabla I. Resumen con promedios de las estructuras medidas en cada grupo (Datos analizados con Stata 10).

	A		B		C	
	Control Sano μ	D. E.	Control Lesionado	D. E.	C US 1 w/cm ² μ	D. E.
Grosor perineuro	13,42	1,19	11,58	0,63	13,35	0,75
Perímetro del núcleo de los neurilemocitos	6,79	0,23	7,11	0,42	7,24	0,23
Perímetro axón mielínico	1,35	0,06	0,94	0,06	1,36	0,05
Perímetro mielina	0,63	0,04	0,53	0,04	0,71	0,04
Ancho del núcleo de fibroblasto	11,05	0,4	10,87	0,18	10,67	0,21
Longitud del núcleo de fibroblasto	16,66	0,68	15,90	0,28	17,67	0,21

DISCUSIÓN

El nervio isquiático de rata presenta diferencias con el humano, una de las que se debe considerar es el número de fascículos. Los nervios estudiados presentan entre 3 y 4 fascículos nerviosos en comparación con los 63 a 70 que se encuentran en el humano, del Sol *et al.* El modelo experimental utilizado fue el propuesto por Luís *et al.* y en esta experiencia fue aplicado modificado en cuanto al tiempo y compresión ejercida. Referente a la respuesta inflamatoria luego de la compresión, se aprecia en los nervios lesionados la presencia de gran cantidad de macrófagos, fundamentando la idea de que el ultrasonido podría dar lugar al fraccionamiento de las células, facilitando la fagocitosis siendo beneficioso sobre la inflamación, proliferación y la maduración de las fases de la cicatrización (Demir *et al.*; De Deyne & Kirsch-Volders, 1995; Schencke & del Sol) pudiendo ser el efecto térmico el principal inductor de la reparación (Draper & Ricard; Chan *et al.*). En relación a los resultados obtenidos en esta experiencia, el perímetro de los núcleos neurilemocitos fue mayor en los grupos que fueron lesionados, este hecho pudiere deberse a la acción de la injuria que desencadenaría un proceso de remielinización por parte de los neurilemocitos aumentan-

do su actividad y volumen, lo cual sería concordante con lo planteado por Chen *et al.*; Rummler & Gupta y Nieto-Sampedro *et al.* Al realizar la comparación general considerando todos los parámetros estudiados entre el grupo B (control lesionado) y grupo C (1w/cm²) se aprecia que la mayoría de los promedios (Tabla I) son mayores en los nervios que recibieron irradiación con ultrasonido. Comprobando la efectividad reparativa de la terapia propuesta por Martínez *et al.* quien señaló que el ultrasonido mejora la nutrición celular incrementando el metabolismo local con estimulación de las funciones celulares y de la capacidad de regeneración tisular. Observando los resultados obtenidos en el grupo C (1w/cm²) se identificaron además focos de fibrosis, conservando el epineuro, y alterando del perineuro y endoneuro en concordancia con López *et al.* y Mazzer *et al.* En conclusión, la irradiación del nervio isquiático de rata lesionado por compresión, en dosis diarias durante 10 días, produjo una acentuación del proceso de remielinización en comparación con los nervios no irradiados, deduciendo que el ultrasonido terapéutico de modalidad continua es efectivo en la regeneración del nervio espinal lesionado.

FARFÁN, E. & MATAMALA, F. Treatment with continuous high-intensity ultrasound on rat sciatic nerve (Sprague Dawley) and compression injuries. *Int. J. Morphol.*, 29(3):787-791, 2011.

SUMMARY: Currently, the pathologies of spinal nerves are of high incidence. As a way to contribute to morphological grounds the application of therapeutic ultrasound was used in the repair of spinal nerves after a compressive injury. 9 tests were carried out using Sprague Dawley rats which were separated into three groups with 3 rats each: A) healthy control, B) injured control and C) the application of therapeutic ultrasound 1w/cm². The rats in groups B and C were anesthetized and sciatic nerve was surgically isolated, which was clamped for 45 seconds with constant force of 40N. Compression was performed on the distal bifurcation 10mm, then disinfected and sutured. 24 hrs after compression, rats in group C were irradiated with a therapeutic ultrasound equipment, using 1w/cm² of intensity with frequency of 3 MHz and a head of 0.5 cm² for 1 minute, for 10 days. 28 days after irradiation sciatic nerve was removed and subjected to routine histological staining with HE and VG. Histopathological diagnosis was made and morphometry which measured: perineum thickness, perimeter of the nuclei of neurolemocyte cell, perimeter of myelinated axons, perimeter of myelin, the fibroblastocyte core width and length of the fibroblastocyte nucleus. The results show that the continuous mode ultrasound stimulates the regeneration of injured spinal nerve compression.

KEY WORDS: Rat ischiatic nerve ; Regeneration; Therapeutic ultrasound.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Berná-Serna, J. D.; Sánchez-Garre, J.; Madrigal, M.; Zuazu, I. & Berná-Mestre, J. D. Ultrasound therapy in rectus sheath hematoma. *Phys. Ther.*, 85(4):352-7, 2005.
- Chan, A. K.; Myrer, J. W.; Measom, G. J. & Draper, D. O. Temperature changes in human patellar tendon in response to therapeutic ultrasound. *J. Athl. Train.*, 33(2):130-5, 1998.
- Chen, Z. L.; Yu, W. M. & Strickland, S. Peripheral regeneration. *Annu. Rev. Neurosci.*, 30:209-33, 2007.
- De Deyne, P. G. & Kirsch-Volders, M. In vitro effects of therapeutic ultrasound on the nucleus of human fibroblasts. *Phys. Ther.*, 75(7):629-34, 1995.
- del Sol, M.; Olave, E.; Contreras, J. & Vásquez, B. Morfometría de los nervios isquiáticos, tibial y fabular común en los hombres. *Int. J. Morphol.*, 28(2):385-8, 2010.
- Demir, H.; Yaray, S.; Kirnap, M. & Yaray, K. Comparison of the effects of laser and ultrasound treatments on experimental wound healing in rats. *J. Rehabil. Res. Dev.*, 41(5):721-8, 2004.
- Draper, D. O. & Ricard, M. D. Rate of Temperature Decay in Human Muscle Following 3 MHz Ultrasound: The Stretching Window Revealed. *J. Athl. Train.*, 30(4):304-7, 1995.
- Habash, R. W.; Bansal, R.; Krewski, D. & Alhafid, H. T. Thermal therapy, part 1: an introduction to thermal therapy. *Crit. Rev. Biomed. Eng.*, 34(6):459-89, 2006.
- López, A.; Aznar, A.; Friend, H. & Díaz, L. Estudio experimental de la neuropatía por compresión en el nervio ciático de la rata, después de la descompresión quirúrgica. *Rev. Esp. de Cir. Ost.*, 101-16, 1990.
- Luís, A. L.; Amado, S.; Geuna, S.; Rodrigues, J. M.; Simões, M. J.; Santos, J. D.; Fregnan, F.; Raimondo, S.; Veloso, A. P.; Ferreira, A. J.; Armada-da-Silva, P. A.; Varejão, A. S. & Maurício, A. C. Long-term functional and morphological assessment of a standardized rat sciatic nerve crush injury with a non-serrated clamp. *J. Neurosci. Methods*, 163(1):92-104, 2007.
- Martínez, M.; Pastor, J. M. & Sendra, F. *Manual de Medicina Física*. Madrid, Harcourt Brace, 1998.
- Matamala, F.; Paredes, M. & Cornejo, R. Low-Energy Laser Effect on Expression of GAP-43 (Growth Associated Protein 43) in Rat Ischiatic Nerve Injury. *Int. J. Morphol.*, 28(3):815-21, 2010.
- Monte-Raso, V. V.; Barbieri, C. H.; Mazzer, N. & Fazan, V. P. S. Effects of therapeutic ultrasound on injuries due to crushing of the sciatic nerve in rats: functional evaluation of gait. *Rev. Bras. Fisioter.*, 10(1):113-9, 2006.
- Mazzer, P. Y.; Barbieri, C. H.; Mazzer, N. & Fazan, V. P. Morphologic and morphometric evaluation of experimental acute crush injuries of the sciatic nerve of rats. *J. Neurosci. Methods*, 173(2):249-58, 2008.
- Nieto-Sampedro, M.; Collazo-Castro, J.; Taylor, J.; Gudiño-Cabrera, G.; Verdú-Navarro, E.; Pascual-Piédrola, J. & Insausti-Serrano, R. Trauma en el sistema nervioso central y su reparación. *Rev. Neurol.*, 35(6):534-52, 2003.
- Rubin, R. Ultrasonic Therapy: Physiological Basis and Clinical Application. *Calif. Med.*, 89(5):349-51, 1958.
- Rummler, L. & Gupta, R. Peripheral nerve repair: a review. *Curr. Opin. Orthop.*, 15(4):215-9, 2004.
- Schenke, C. & Del Sol, M. Morphologic Changes of the Regeneration in the Rat's (Sprague Dawley) Calcaneus Tendon by Continuous Ultrasound Applications. *Int. J. Morphol.*, 28(2):601-8, 2010.
- Seddon, I. & Herbert, J. *Surgical disorders of the peripheral nerves*. London, Churchill Livingstone, 1975.

Dirección para correspondencia:
Emilio Farfán Cabello Cabello
Río de La Plata
Villa Los Ríos
Temuco - CHILE

Email: Milokine@gmail.com

Recibido : 19-04-2011
Aceptado: 17-06-2011