

*Microneurocirugía  
Experimental*

*José M. González Darder*







# **Microneurocirugía Experimental**

**José M. González Darder**

*Departamento de Cirugía  
Universidad de Cádiz*

**SERVICIO DE PUBLICACIONES. UNIVERSIDAD DE CADIZ**

**1992**



Edita: Servicio de Publicaciones de la Universidad de Cádiz  
I.S.B.N.: 84-7786-101-3  
Dep. legal: CA-766-92  
Imprime: INGRASA Artes Gráficas. Puerto Real (Cádiz).

# Colaboradores

Diego Cañadas Rodríguez	Profesor Asociado Departamento de Cirugía Universidad de Sevilla
José L. Gil Salú	MIR de Neurocirugía Hospital de Navarra Pamplona
Efrain Gómez Cárdenas	MIR de Neurocirugía Hospital Universitario Virgen del Rocío Sevilla
José M. González Darder	Neurocirujano Profesor Titular de Cirugía Responsable Grupo 3080 de la Junta de Andalucía Director Servicio Microcirugía Universidad de Cádiz
Federico Portillo Pacheco	Profesor Ayudante Departamento de Neurociencias Universidad de Cádiz.
Ignacio Ruz Franzl	Becario de Investigación Grupo 3080 de la Junta de Andalucía Universidad de Cádiz



## PROLOGO

*Esta publicación es el producto del trabajo de los miembros del Grupo de Investigación 3080 de la Junta de Andalucía. El Grupo se constituyó formalmente en el año 1986, para dedicarse al estudio e investigación básica en Neurocirugía Funcional, siguiendo de esta forma las líneas de trabajo emprendidas años atrás por varios de sus miembros. Por motivos obvios, el trabajo del Grupo implica el uso de la rata como animal de experimentación y del microscopio quirúrgico para realizar las diferentes técnicas experimentales que supongan la manipulación de las estructuras nerviosas y vasculares del animal. El enfoque de la obra es consecuencia de este planteamiento, habiéndose recopilado las diferentes técnicas experimentales microquirúrgicas de interés en Neurociencias, precedidas de su fundamento de anatomía microquirúrgica y seguidas de una serie de procedimientos cuyo objetivo es valorar la técnica realizada. Se trata pues de aportar al investigador en Neurociencias un conjunto de elementos básicos para el diseño de experiencias con las que testar sus hipótesis de trabajo.*

*El trabajo ha contado con la ayuda fundamental de los Dres. Cañadas, Gil Salú, Gómez Cárdenas, Portillo y Ruz Franzí, aunque otros muchos colaboradores del Grupo 3080 han realizado múltiples aportaciones que de una u otra forma aparecen recogidas en este trabajo. Para la publicación de la obra se ha contado con el apoyo de la Universidad de Cádiz a través de su Servicio Central de Publicaciones, quedando a cargo de INGRASA la labor de impresión.*

Cádiz, julio de 1992

**José M. González Darder**





## INDICE

Capítulo 1	
Historia de la Microneurocirugía .....	11
Capítulo 2	
Laboratorio de Microcirugía .....	17
Capítulo 3	
Manejo del Animal de Experimentación. Rata Blanca .....	23
Capítulo 4	
Técnicas sobre Vasos .....	33
Capítulo 5	
Técnicas sobre los Nervios Periféricos .....	53
Capítulo 6	
Técnicas sobre el Raquis, Médula y Raíces .....	75
Capítulo 7	
Técnicas sobre el Cráneo y el Cerebro .....	97
Capítulo 8	
Técnica Estereotáctica .....	111
Capítulo 9	
Técnicas con Médula Suprarrenal .....	131





# HISTORIA DE LA MICRONEUROCIROGIA

---

I. Introducción

II. Microneurocirugía

---



## I. INTRODUCCION

La primera referencia que existe de la llamada “medicina de laboratorio”, data de mediados del siglo XIX, surgiendo al amparo de personalidades como Louis Pasteur (1822-1895), Claude Bernard (1813-1878) y de la Sociedad de Biología Francesa (1848). En 1856 se publica el primer artículo científico de investigación básica en el que se usa a la rata como objeto del trabajo experimental (J.M. Philipeaux: “Note sur l’extirpation des cápsules surrenales chez rats albinos (mus rattus)” en C.R. Acad. Sci., París 43, 904), aunque autores como Hunter (1728-1793) experimentaron con anterioridad extensamente en animales, dando un enfoque fisiológico a sus trabajos. Desde entonces hasta nuestros días, el perfeccionamiento en las técnicas experimentales no ha cesado, permitiendo al investigador elegir el abordaje práctico en el animal de experimentación de la manera más óptima.

La metódica aplicación del microscopio al estudio de los seres vivientes, desde el empleo de los objetivos acromáticos de J y H Van Deyl a finales del siglo XVIII, tuvo un considerable progreso técnico durante el siglo XIX, posibilitando la edificación de la anatomía patológica microscópica y de la medicina anatomoclínica moderna. Sin embargo, su empleo en la clínica diagnóstica y en la técnica quirúrgica no se hace hasta mucho mas tarde, en pleno siglo XX.

## II. MICRONEUROCIROGIA

En el campo de la Neurocirugía y tras dos valiosas monografías clínicas de Chassaignac (1842-1848), la actual técnica neuroquirúrgica nace con Broca (1861), se fundamenta con Horsley a partir de 1886, pero no alcanza su plena madurez hasta 1912, gracias a los decisivos estudios experimentales, clínicos y operatorios de Cushing en Harvard.

En este avance vertiginoso que la Medicina científica adquiere durante el presente siglo, uno de los progresos técnicos que ha provisto a los neurocirujanos de la capacidad de dominar ciertas intervenciones quirúrgicas ha sido el empleo del Microscopio



Quirúrgico y de las técnicas microquirúrgicas. Si bien el empleo del Microscopio Quirúrgico era común entre los oftalmólogos y otorrinolaringólogos desde mediados de los años 1920, y a que autores como Kurze lo usaban a título individual en la práctica clínica ya en 1957, su introducción en la cirugía del Sistema Nervioso se hace en la década de los sesenta a partir de una serie de grupos estadounidenses interesados en la técnica. En Europa, los primeros indicios de su utilidad neuroquirúrgica los vislumbró Yasargil para el tratamiento de la patología vascular y tumoral del Sistema Nervioso Central. Posteriormente, numerosos autores pusieron de manifiesto la disparidad de resultados quirúrgicos para un mismo proceso patológico, según se emplearan o no técnicas microquirúrgicas. Ello popularizó el empleo de las técnicas microquirúrgicas para el tratamiento quirúrgico de la patología vascular, tumoral y malformativa a nivel craneal y raquídeo. Yasargil y Donaghy desarrollaron la anastomosis extra-intracraneal y la cirugía de los aneurismas. Jannetta describe la descompresión microvascular del trigémino para el tratamiento de la neuralgia esencial. Hardy reintroduce la cirugía transesfenoidal de la hipófisis gracias al empleo del microscopio quirúrgico. Yasargil introduce la discectomía lumbar microquirúrgica. En relación al Sistema Nervioso Periférico destacan los avances que supusieron la realización por Smith de una neurorrafia con microscopio quirúrgico, el desarrollo de la neulolisis por Samii, la implantación de las técnicas de suturas interfasciculares por Millesi, la cirugía del plexo braquial por Narakas y Morelli, o la reparación de una parálisis facial por Anderl.

A nivel experimental las técnicas microquirúrgicas tienen sus primeros antecedentes en el intento de Carrell en 1902 de la triangulación excéntrica como proceder operatorio para la anastomosis entre vasos sanguíneos. En 1921, Nylen utiliza por primera vez el microscopio quirúrgico, no siendo hasta 1960 cuando su empleo se generaliza gracias a la publicación por Jacobson y Suárez de anastomosis de estructuras vasculares de menos de 3 mm de diámetro.

En el campo de la experimentación animal, las técnicas microquirúrgicas han pasado a formar parte del arsenal metodológico por variadas e importantes razones:

- Suponen un paso preliminar inexcusable en el entrenamiento del Neurocirujano para su posterior utilización clínica.
- El empleo de pequeños animales de laboratorio obliga a conocer su manejo a todo experimentador que desee manipular estructuras neurológicas, lo que repercute favorablemente en el desarrollo de la especialidad.
- La mejora en los materiales empleados ha simplificado los sistemas ópticos, de forma que es fácil el trabajo en el Laboratorio y puede trasladarse la experiencia al Quirófano.
- Los resultados obtenidos con la técnica quirúrgica avalan su eficacia, por lo que el Laboratorio debe ser accesible a todo clínico y disponer del material microquirúrgico básico.

## REFERENCIAS

- Donaghy RMP, Yasargil MG (eds): *Micro-Vascular Surgery*. Stuttgart. George Thieme Verlag. 1967.
- Laín Entralgo P. *Historia de la Medicina*. Barcelona, Salvat. 1981.
- Rand RW (ed). *Microneurosurgery*, 3 ed. St Louis-Toronto-Princeton, CV Mosby Co, 1985
- Yasargil MG. *Microsurgery Applied to Neurosurgery*. Stuttgart. Georg Thieme Verlag. 1969
- Yasargil MG. *Microneurosurgery*. Stuttgart. Georg Thieme Verlag. 1984.



# 2

## LABORATORIO DE MICROCIRUGIA

---

- I. Laboratorio de Microcirugía
  - II. Microscopio Quirúrgico
    - A. Uso y Cuidados del Microscopio Quirúrgico
-





## **I. LABORATORIO DE MICROCIURUGIA**

El Laboratorio de Microcirugía es donde deben estar reunidos los recursos técnicos que permitan la práctica de las técnicas microquirúrgicas. Su estructura arquitectónica y dotación son muy variables de acuerdo a los objetivos que se pretendan alcanzar.

El Servicio Central de Microcirugía de la Universidad de Cádiz consta de una Sala de microscopios para trabajo y docencia, con seis puestos de trabajo dotados de microscopios OPMI-99 con soporte fijo en la mesa y un microscopio OPMI-6 CFR, de pié móvil y que lleva montada una cámara de vídeo conectada a un magnetoscopio y a tres monitores distribuidos por la sala. Los puestos tienen una mesa de trabajo amplia y un taburete de altura regulable para ajustarla estrictamente a la que se precise para el trabajo (Figura 2-1). Esta sala de trabajo y docencia está anexa a otra sala de trabajo y preparación de animales, dotada a su vez de un microscopio OPMI-1, con cámara fotográfica, y donde se montan las técnicas complementarias que adicionalmente requieran los investigadores para el desarrollo de las experiencias. Finalmente, existe una sala de trabajo, estudio y reunión para diseño y discusión de los trabajos en marcha. El laboratorio está cercano a la zona de cría y estabulación de los animales que se emplean en el mismo, de forma que se evita estrictamente el mantenimiento de animales en el Laboratorio.

## **II. MICROSCOPIO QUIRURGICO**

El microscopio quirúrgico es el elemento fundamental en la microcirugía, ya que concede al cirujano las mejores condiciones de iluminación, aumento y profundidad de campo. Frente al microscopio quirúrgico, el empleo de lentes acopladas a gafas supone una gran fuente de problemas (falta de iluminación coaxial, aumento único, distancia interpupilar no variable) y de cansancio (por la necesidad de mantener el cirujano la distancia focal). La lupa binocular obvia alguno de estos problemas, pero carece de iluminación coaxial. Los modelos de microscopio quirúrgico mas ampliamente difundidos pertenecen a la marca Carl Zeiss, aunque existen cada vez mas unidades de la casa Wild.

La iluminación del microscopio está asegurada por una fuente de luz coaxial, es decir, que mediante una serie de lentes se dirige hacia el campo quirúrgico en el mismo

sentido que la visión. La lámpara es de tungsteno y se encuentra en un lugar accesible para su recambio, si fuera necesario. Esta luz coaxial puede aumentarse, si se considera necesario, mediante fuentes adicionales de luz fría enfocadas al campo operatorio.

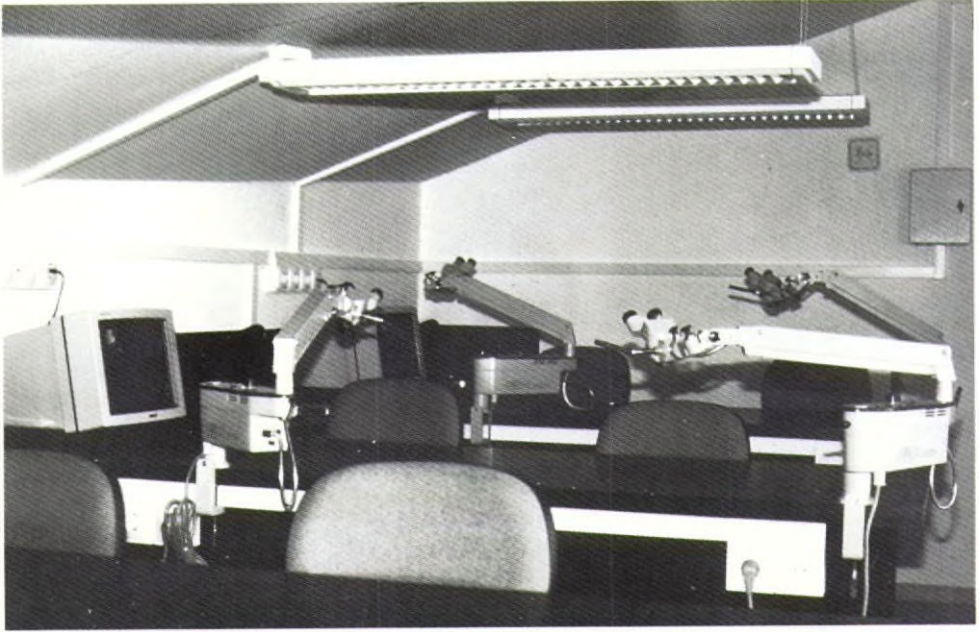
La magnificación depende de la distancia focal del objetivo y de los aumentos del ocular. Los microscopios convencionales (OPMI-1 y OPMI-99) están dotados de un 'revólver' que permite varias posiciones con diferentes aumentos. El revolver del OPMI-1 tiene cinco posibilidades, que para un objetivo de 200 mm y un ocular de x10 permiten una magnificación desde 5.0 en la posición '10x' (con un campo iluminado de 40 mm de diámetro) hasta 20.0 en la posición '40x' (con un campo iluminado de 10 mm de diámetro). El revólver del OPMI-99 tiene tres posiciones (0.6-1-1.6). El cambio de magnificación implica cambiar la posición del microscopio para seguir manteniendo el enfoque. También al aumentar la magnificación se pierde luminosidad, de forma que en el OPMI-1 existen dos intensidades de luz, mientras que en el OPMI-99 hay un dial que permite variar de forma lineal la intensidad de luz. En los microscopios más modernos, como el OPMI-6 (Figura 2-2), la iluminación se transmite por fibra óptica, el sistema de aumento es tipo zoom con relación 1:6 en el OPMI-6, manejándose mediante un electromotor con un pedal tanto el zoom como el enfoque, mientras que la intensidad de luz se regula manualmente.

Con independencia del sistema de aumento e iluminación, el microscopio tiene una serie de elementos adicionales que le confieren infinidad de variaciones. En principio, el sistema óptico puede estar montado sobre un soporte estático o dotado de un pie móvil. En las salas de prácticas de microcirugía suelen existir microscopios fijos a la mesa de trabajo, mientras que en los quirófanos clínicos el microscopio está montado sobre un pie móvil o fijo al techo. El otro complemento necesario en el laboratorio de microcirugía es un sistema de recogida de imágenes en fotografía o vídeo. Tanto la máquina de fotografiar como el vídeo están montados sobre una pieza intermedia que permite colocar uno o varios tubos de extensión laterales donde se ajustan. La cámara de vídeo se conecta a uno o varios monitores para que los alumnos sigan el desarrollo de la cirugía. Finalmente, existen múltiples tipos de oculares (rectos, inclinados, de inclinación variable, con cambio de distancia interpupilar), lentes oculares y objetivos.

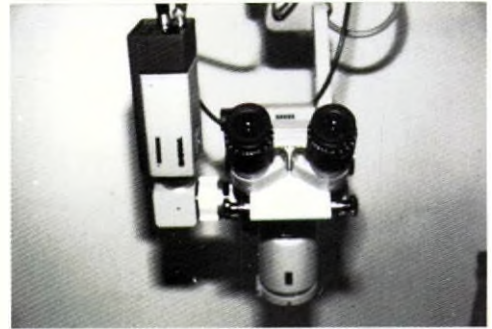
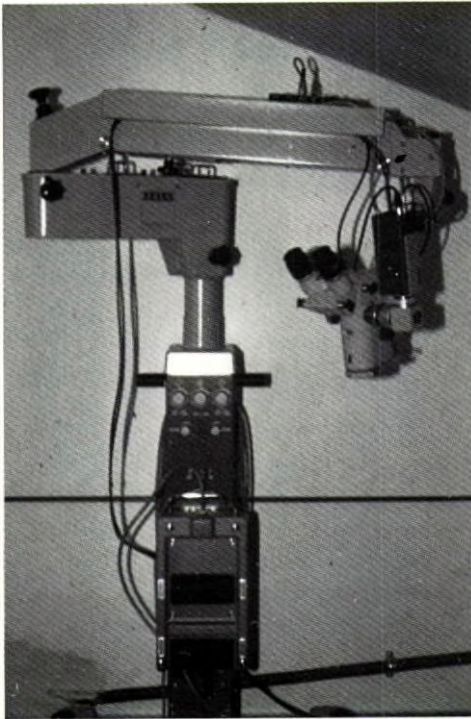
### **A. Uso y Cuidados del microscopio quirúrgico.**

El empleo del microscopio quirúrgico ha de resultar cómodo para el cirujano, y es precisamente el hecho de que el cirujano se encuentre cómodo lo que indica que se ha dominado su empleo. Las primeras sesiones utilizando el microscopio quirúrgico se caracterizan por la dificultad para enfocar, localizar los elementos anatómicos y de instrumental y coordinar la acción de las manos con el alineamiento de la cabeza y con la magnificación, y se siguen no raramente de dolor de cuello o mareos. Con la práctica el empleo del microscopio llega a realizarse con naturalidad.





*Figura 2-1.- Sala de microscopios del Servicio Central de Microcirugía de la Universidad de Cádiz, en la Facultad de Medicina.*



*Figura 2-2.- Microscopio Zeiss OPMI-6, en el que se aprecia el pie móvil, con los mandos de intensidad de luz y los pedales para el control del zoom y distancia. En el detalle del sistema óptico se ven los oculares y la cámara de vídeo montada sobre un tubo coaxial.*

Los cuidados del microscopio quirúrgico son mínimos pero necesarios. Cuando no se use estará cubierto para prevenir el polvo, y la habitación estará ventilada para evitar la excesiva humedad que puede hacer crecer hongos en las lentes o espejos. Cuando se use la lámpara se mantendrá sin cubrir para evitar el excesivo calentamiento. Las lentes deben limpiarse de forma periódica. Se dispondrá a mano de una lámpara de repuesto para el caso de que se funda la que se está empleando.

## REFERENCIAS

- Morales Ramos F. *Técnica Microquirúrgica. Guía para su aprendizaje*. Sevilla, Pecuatro. 1980.
- Rand RW, Kleinberg LK. The surgical microscope: its use and care. En Rand RW (ed): *Microneurosurgery*. St Louis-Toronto-Princeton. C.V. Mosby Co., 3ªed, pp 9-22.
- Rand RW, Rand RP, Khonsary A. Microneurosurgical instrumentation. En Rand RW (ed): *Microneurosurgery*. St Louis-Toronto-Princeton. C.V. Mosby Co., 3ªed, pp 23-48.

# 3

## MANEJO DEL ANIMAL DE EXPERIMENTACION: RATA BLANCA

---

- I. Algunos Aspectos de la Fisiología de la Rata
  - II. Estabulación
  - III. Anestesia
  - IV. Aspectos Generales de la Técnica Quirúrgica
    - A. Instrumental
    - B. Asepsia
    - C. Iluminación
    - D. Coagulación
  - V. Sacrificio y Necropsia
  - VI. Aspectos Éticos y Normativa
-





De entre todos los animales de laboratorio, el de mas interés para la realización de técnicas microquirúrgicas es la rata blanca. Ello se debe a que posee estructuras anatómicas de tamaño adecuado para llevar a cabo técnicas microquirúrgicas. Por ello vamos a describir a continuación las características mas importantes en lo que se refiere a su manejo.

## **I. ALGUNOS ASPECTOS DE LA FISIOLOGIA DE LA RATA**

Los roedores en general, y la rata en particular, son los animales de experimentación más utilizados. Ello se debe a que reúnen una serie de ventajas, como un coste relativamente bajo, facilidad de manipulación y mantenimiento en cautividad, resistencia a las infecciones y traumas quirúrgicos, ser animales muy prolíficos y que alcanzan la edad adulta con relativa velocidad y, finalmente, porque se dispone de cepas que se han llegado a convertir en universales y por tanto utilizables en cualquier laboratorio del mundo. Las cepas de ratas mas utilizadas son la Wistar y la Sprague-Dawley.

Los datos biológicos más importantes de la rata blanca son los siguientes:

1. Parámetros demográficos: la vida media es de unos dos años, naciendo en camadas de 8-12 animales tras un periodo de gestación de 21 (20-22) días. Las ratas que fallecen de causas naturales tienen un importante porcentaje de tumores (hipófisis, órganos reproductores, piel, mama) y glomerulonefritis.

2. Parámetros ponderales: el peso al destete es de unos 40-45 g, alcanzando a las seis semanas un peso de unos 120 g. Generalmente se utiliza de forma rutinaria la rata macho, siendo el peso ideal para trabajar con el mismo de unos 200-225 g, lo que corresponde a una edad de 8-9 semanas.

3. Parámetros vitales: la frecuencia cardiaca es de unos 400 (330-480) latidos por minuto, con una presión arterial de 130/90 mm hg. El hematocrito es del 44% y el volumen hemático es del 6% del peso corporal. La frecuencia respiratoria es de 90 (60-140) respiraciones por minuto. La temperatura corporal rectal es de 38.1 (37.7-38.5) °C. La diuresis media es de 15-30 ml/día

## II. ESTABULACION

Las ratas de laboratorio a utilizar en experimentación animal deben vivir en unas condiciones de estabulación estandarizadas que aseguren la reproductibilidad de las experiencias. Estas condiciones deben estar garantizadas por el Centro de Estabulación, siendo los mínimos necesarios una temperatura de 20-24 °C, humedad relativa de 40-70%, limpieza de aire con sistemas de aire acondicionado, nivel constante de ruido de fondo e iluminación en ciclos alternos de 12 horas de luz y oscuridad.

Los animales se alojan en cajas con un fondo de viruta, que debe mantenerse limpia. La superficie mínima de la caja para la rata es de 350 cm<sup>2</sup>, con una altura mínima de 14 cm. Las ratas se alojan en grupo, pero en el postoperatorio es preciso mantenerlas aisladas, ya que de lo contrario pueden mordisquearse las heridas operatorias o atacar a un animal todavía anestesiado. El alojamiento individual produce cierto grado de stress, por lo que debería ser lo mas corto posible. Las jaulas están construidas de plástico, con una rejilla superior en la que se coloca la comida y un biberón. La comida habitual de mantenimiento se presenta en forma de gránulos, y el consumo medio diario de una rata adulta es de unos 5-8 g/100 g de peso. El biberón está lleno de agua corriente para bebida, con un consumo de unos 10 ml/100 g de peso.

## III. ANESTESIA

Existen diferentes métodos para la anestesia de la rata, pero sólo vamos a describir el mas ampliamente empleado por nuestro grupo y de demostrada utilidad para llevar a cabo cualquier técnica microquirúrgica. Se prepara una solución de clorhidrato de ketamina (60 mg/kg), diacepam (6 mg/kg) y atropina (2 mg/kg) en una jeringa de insulina. La ketamina no asegura una relajación muscular, por lo que se asocia el diacepam, pero tiene la ventaja de que no deprime los reflejos deglutorio y tusígeno y mantiene una buena presión arterial. Esto permite además que no sea necesario un periodo previo de ayuno. En técnicas muy dolorosas deben asociarse analgésicos o, como durante la manipulación de nervios o raíces espinales, aplicar anestésicos locales.

La anestesia se introduce por vía intraperitoneal. Para ello se punciona la cavidad abdominal en su cuadrante inferior izquierdo, con lo que se evita la punción accidental del hígado o intestino grueso. La inyección intrahepática, o en cualquier otra estructura muy vascularizada, produce generalmente la muerte del animal por sobredosis anestésica. Por otro lado, la inyección en el intestino grueso se sigue de la expulsión inmediata del anestésico por el ano, lo que se confunde a veces con una micción, y el animal no se duerme.

La pauta anestésica descrita induce la anestesia en unos 5-10 minutos y dura unos 45 minutos.

Cuando se emplea esta pauta anestésica se puede mantener una ventilación espontánea sin necesidad de intubación o traqueotomía. Ocasionalmente puede ser conveniente



colocar un tubo en la boca del animal para que no caiga la lengua. Cuando se desee la intubación traqueal se aborda la tráquea a través de una incisión cervical medial, disecando la musculatura pretraqueal infrahioidea. Se abre con una tijera entre dos anillos traqueales y se introduce un tubo de calibre adecuado y de corta longitud para evitar un espacio muerto demasiado grande (Figura 3-1). El tubo puede dejarse abierto o conectado a una máquina de ventilación, generalmente de volumen constante y donde pueda programarse el número de respiraciones por minuto y el volumen (Harvard Rodent Ventilator, Harvard Apparatus, USA). El aire de la ventilación puede ser el ambiental o enriquecerse con oxígeno.

El adecuado nivel de anestesia se reconoce por una mínima respuesta a los estímulos dolorosos, quietud y relajación de la musculatura esquelética y ausencia de trastornos respiratorios, cardiovasculares o gastrointestinales. La anestesia demasiado profunda se reconoce por la ausencia completa de respuestas a los estímulos dolorosos, flacidez muscular que conduce a la insuficiencia ventilatoria, problemas cardiocirculatorios (bradicardia, taquicardia, hipotensión), respiratorios (hipoventilación, paro) o intestinales (atonía intestinal con íleo paralítico postoperatorio). Por el contrario, la anestesia insuficiente se reconoce porque la respuesta del animal a los estímulos dolorosos es manifiesta en forma de movimientos o vocalizaciones, taquipnea y respiraciones profundas, hipo o hipertensión arterial, taquicardia o arritmias y movimientos tusígenos o laringoespasmos y secreciones.

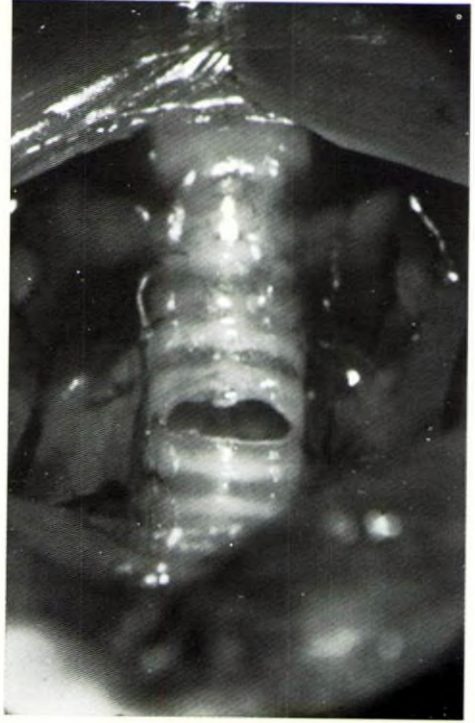
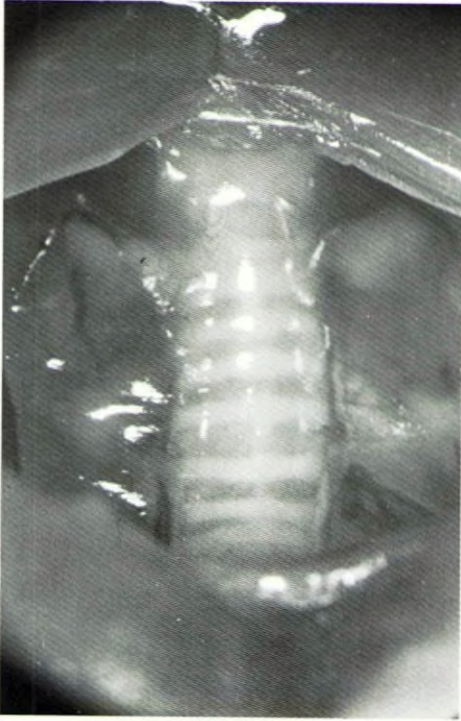
El accidente anestésico más frecuente es la parada respiratoria. La reanimación respiratoria se hace sacando la lengua con unas pinzas y separando los dientes con un tubo, a través del que se puede soplar unas cuantas veces. Si la rata no recupera el ritmo respiratorio se coloca entonces en decúbito supino, realizando compresiones rítmicas del tórax. Estas maniobras son fáciles y se siguen en muchas ocasiones de la recuperación del animal. Una complicación frecuente en la anestesia es la hipotermia, que se puede prevenir colocando el animal debajo de un foco de luz o encima de una almohadilla eléctrica y controlando la temperatura rectal con un termómetro digital.

#### **IV. ASPECTOS GENERALES DE LA TECNICA QUIRURGICA**

Vamos a desarrollar en este punto los elementos básicos que han de considerarse a la hora de realizar cualquier manipulación quirúrgica en la rata, teniendo en cuenta que los detalles de las diferentes técnicas microquirúrgicas serán expuestos en los capítulos correspondientes.

##### **A. Instrumental**

Como mesa operatoria se emplea una tabla de madera, cubierta de material plástico aislante y, a ser posible, de material que tolere bien la humedad con la finalidad de que



*Figura 3-1.- Secuencia quirúrgica de la traqueotomía en la rata. Se aprecia la disección de la tráquea, apertura de la misma entre dos anillos traqueales y, finalmente, la colocación de un tubo de calibre adecuado.*



no se hinche o altere como consecuencia del lavado. Se recomienda proveer a la tabla de unos orificios regularmente repartidos cerca de su borde para sujetar elementos de tracción. Las medidas de la tabla son de unos 25x40 cm.

El material quirúrgico elemental consta de tijeras fuertes (para abrir la piel), pinzas de disección de Adson sin dientes, tijeras finas cortas (para diseccionar o cortar los planos musculares), separadores autostáticos pequeños de garras afiladas, portagujas corto, dos pinzas de relojero del n.5 con puntas romas (una de ellas puede actuar de portaagujas para microcirugía) y una tijera de microcirugía (Figura 3-2). Como material adicional para cirugía de cráneo y raquis se precisa un raspador pequeño (para desperiostizar), una microgubia (se emplea para este fin material de manicura), un perforador y una fresa con motor eléctrico.

Es conveniente tener a mano material para hemostasia (torundas de algodón o mejor de papel absorbente, tiras de material hemostático tipo Surgicel o Espongostan, cera de hueso) y lavado (una solución fisiológica templada). Algunas veces se precisan drogas para su utilización local, siendo las más frecuentes anestésicos locales (preferiblemente de acción ultrarrápida), vasodilatadores (papaverina) o anticoagulantes (heparina), así como una dosis anestésica suplementaria por si fuera necesario.

Como material de sutura se emplea la seda o dextron con aguja triangular de 4/0 y de 2/0 (Lorca Marín, Murcia). El músculo se cierra con puntos sueltos de 4/0. La piel es bastante dura y puede cerrarse con puntos sueltos o continuos de seda. La rata tiende a mordisquear la herida quirúrgica si le resulta alcanzable, por lo que el cierre debe ser cuidadoso y dejando los cabos de la sutura muy cortos.

## **B. Asepsia**

En principio no es necesario emplear ninguna técnica de esterilización del material quirúrgico o de sutura que se emplee en la cirugía de la rata. En todo caso, aunque solo sea por motivos éticos y estéticos, se recomienda una cuidadosa limpieza del material quirúrgico una vez terminada cada sesión quirúrgica. Sin embargo, cuando se emplean materiales a implantar de cierto tamaño (catéteres, bombas mini-osmóticas, etc), es conveniente mantener las mismas unos minutos en el interior de alguna solución antiséptica (Hibitane diluido) antes del implante. También es necesario el rasurado del pelo en la zona operatoria, que puede hacerse con una rasuradora eléctrica o con una crema depilatoria de cosmética. El campo se pinta con una solución antiséptica, lo mismo que tras cerrar la herida operatoria. Ocasionalmente se producen infecciones locales, que suelen quedar restringidas en forma de abscesos subcutáneos bien delimitados. Algunos de estos animales sufren un deterioro general, con pérdida de peso y adelgazamiento progresivo siendo recomendable su sacrificio.



**Figura 3-2.-** Material básico de microcirugía.



**Figura 3-3.-** Fotografía que muestra a la izquierda una fuente de luz fría, con dos brazos articulables independientes junto a un aparato de coagulación bipolar, con su pedal y pinzas conectadas al cable.

### C. Iluminación

Cuando se trata de técnicas microquirúrgicas la iluminación está asegurada por el propio microscopio, que dispone de una luz fría y coaxial, generalmente de potencia variable, y por lo tanto ideal. En las fases previas y posteriores al empleo del microscopio la iluminación se asegura con lámparas convencionales o con sistemas de luz fría, orientables y que permiten su uso con lupas o instrumentos de aumento sin iluminación propia (Euromex Fiber Optic Light Source, EUROMEX, Holanda) (Figura 3-3).

### D. Coagulación

La mayor parte de los procedimientos quirúrgicos pueden hacerse sin problema de hemorragia si se emplean las vías de abordaje adecuadas. El control de la hemorragia o la exclusión de determinados vasos se consigue con facilidad mediante la coagulación bipolar (Malis Bipolar Coagulator CMC-1, Codman & Shurtleff, USA) (Figura 3-3). La coagulación bipolar se caracteriza porque ésta se produce entre las dos puntas de la pinzas, no precisando placa. Para evitar la formación de costras en la pinza se requiere una cierta humedad del campo quirúrgico, por lo que se recomienda bañar con suero el mismo cuando se quiera hacer uso de la coagulación.



## V. SACRIFICIO Y NECROPSIA

El sacrificio del animal debe hacerse siempre siguiendo normas éticas y el método dependerá del objetivo. Cuando se trata de eliminar animales sin utilidad posterior el mejor método es la conmoción cerebral seguida de la dislocación cervical. Si el golpe en la cabeza es lo suficientemente violento y experto, el animal fallece instantáneamente. Alternativamente puede utilizarse una sobredosis anestésica administrada por vía intraperitoneal o la exanguinación o administración de una dosis de cloruro potásico en el animal previamente anestesiado. Otros métodos son violentos o estresantes, como la decapitación o la inhalación de cloroformo o éter.

Sin embargo, la mayor parte de las veces el sacrificio del animal es precedido de la recogida de muestras y se sigue de la recogida de tejidos. En estos casos se anestesia el animal de la forma descrita y se toman las muestras deseadas. Posteriormente se hace una fijación 'in vivo'. Para ello la rata se coloca en decúbito supino en una tabla metálica perforada y colocada en una batea y se abre el abdomen y tórax, exponiendo el hígado y el corazón e identificando la aurícula derecha y el ventrículo izquierdo. La punta del ventrículo se abre y se inserta una cánula conectada a un tubo por donde entrará la solución de fijación. Inicialmente se pasa una solución fisiológica (Ringer lactato o suero fisiológico) durante 30-60 segundos e inmediatamente después la solución fijadora (solución tamponada de formol al 10% para histología convencional o solución de gluteraldehído con buffer fosfato y cacodilate para microscopía electrónica). La aurícula derecha se abre de un tizeretazo y por ella saldrá la sangre y, posteriormente, los líquidos de perfusión. La perfusión se hace a una presión de unos 60-90 mmHg. Dependiendo de la zona donde se encuentren los especímenes a recoger puede clamparse la aorta descendente, con lo que se ahorra líquido de fijación. La perfusión se mantiene durante unos 15-30 minutos y termina cuando el efluente es limpio, el aspecto del hígado es blanquecino y la consistencia del animal es firme. Generalmente se emplea un volumen de 200-250 cc de líquido de fijación.

Tras la fijación 'in vivo' se reseca la porción orgánica donde se halla la zona a estudiar, y se deja en reposo durante varias horas en una nevera dentro de un recipiente cerrado y lleno de líquido de fijación. Se procede entonces a la disección de la zona de interés y a la obtención de las muestras, preferentemente usando técnicas microquirúrgicas.

## VI. ASPECTOS ETICOS Y NORMATIVA

Queda fuera del objetivo de esta capítulo el hacer una exposición de los aspectos éticos involucrados en la experimentación animal. Existen una serie de guías, recomendaciones y leyes que sirven de referencia para el manejo de los animales de experimentación. A continuación damos una breve reseña de los documentos más importantes del momento actual:

1. Ethical Guidelines for Investigations of Experimental Pain in Conscious Animals (Pain, 16:109-110,1983): guías y recomendaciones de la International Association for the Study of Pain (IASP) acerca del trabajo con modelos de dolor agudo y crónico.

2. Ethical Standards for Investigations of Experimental Pain in Animals (Pain, 9:141-142,1980): editorial de Pain, donde se recoge una lista de modelos de dolor considerados válidos.

3. International Guiding Principles for Biomedical Research Involving Animals (CIOMS, Geneva,1985): normas del Council for International Organizations of Medical Sciences (CIOMS) para el manejo de animales en investigación biomédica, incluyendo la recomendación de métodos alternativos al uso de animales.

4. Real Decreto 233/1988, de 14 de marzo, sobre protección de los animales utilizados para experimentación y otros fines científicos (BOE 67, de 18 de marzo): se trata de la aplicación a nuestro país de la Directiva del Consejo 86/609/CEE sobre el tema, y constituye el principal documento de referencia en este momento.

## REFERENCIAS

AVMA Panel on euthanasia. *JAVMA* 188:252-268, 1986.

Bolant Hernández B, Calvo Bermúdez MA, Cejalvo Lapeña D, Gimeno Forner LO, Gimeno Forner L, Loris Carsí. La eutanasia en los animales de laboratorio. *Res Surg suppl* 5:45-56,1990.

Friedrich VL, Mugnaini E. Electron microscopy. Preparation of neural tissues for electron microscopy. En Heimer L, RoBards MJ (eds): *Neuroanatomical Tract-Tracing Methods*. New York-London. Plenum Press, 1981. pp 345-375.

Gimeno Forner L, Cejalvo Lapeña D, Bolant Hernández B, Calvo Bermúdez MA, Todolí Faubell J, Loris Carsí. Ética y legislación en los animales de laboratorio. *Res Surg suppl* 3: 18-28,1989.

Gimeno Forner L, Gimeno Forner LO, Cejalvo Lapeña D, Calvo Bermúdez MA, Bolant Hernández B, Loris Carsí. Anestesia en el animal de laboratorio. Parte 2. *Res Surg suppl* 5:36-44,1990.

Waynforth HB. *Experimental and Surgical Technique in the Rat*. London. Academic Press, 1980.

# 4

## TECNICAS SOBRE VASOS

---

- I. Introducción
  - II. Anatomía Microquirúrgica
    - A. Arteria Carótida Común y Yugular Externa
    - B. Arteria y Vena Femorales
    - C. Arteria Aorta Abdominal
    - D. Corazón
  - III. Técnicas de Microcirugía Vascular
    - A. Sutura Arterial
    - B. Sutura Venosa
    - C. Fístula Arteriovenosa
    - D. Aneurismas
    - E. Colocación de Catéteres Crónicos
  - IV. Valoración de las Técnicas
    - A. Arteriografía
    - B. Medida del flujo
    - C. Técnicas Histológicas
    - D. Estudios "in vitro"
-





## I. INTRODUCCION

La realización de técnicas microquirúrgicas sobre vasos tuvo un gran interés en el campo neuroquirúrgico hace años, cuando se introdujo la anastomosis extra-intracraneal para el tratamiento de la isquemia cerebral. Ello inició una gran cantidad de estudios destinados a conocer cuál era el mejor tipo de sutura (puntos sueltos, sutura continua, sutura mecánica, métodos sin sutura con adhesivos o laser, etc) y las repercusiones que dichas técnicas tenían sobre el endotelio y el flujo sanguíneo. La demostración de que la anastomosis extra-intracraneal no aporta mejores resultados que el uso de antiagregantes plaquetarios en los pacientes con isquemia hizo que dicha técnica fuera abandonada, reservándose para casos muy seleccionados de tratamiento de isquemia y preventivamente en tumores o lesiones vasculares donde la cirugía puede seguirse con gran probabilidad una situación de isquemia cerebral.

Sin embargo, la microcirugía vascular continua teniendo interés ya que es imprescindible para determinadas técnicas quirúrgicas como son la reparación de lesiones vasculares, reimplantación de extremidades o los injertos con pedículo vascular. Por otro lado, en todas las especialidades, el manejo microquirúrgico adecuado de las estructuras vasculares confiere al que lo domina unas habilidades extraordinarias sobre cualquier otro sustrato que implique el empleo de la técnica microquirúrgica. Finalmente, la microcirugía vascular es interesante para la preparación de determinados modelos animales donde se estudia la fisiopatología vascular o donde el tamaño de las estructuras involucradas exige utilizar una técnica microquirúrgica.

En la cirugía vascular es necesario el empleo del microscopio quirúrgico para el manejo de vasos menores de 3 mm de diámetro, siendo posible el trabajo sobre vasos de hasta 0.5 mm de diámetro. Esta técnica surge en los años sesenta cuando cirujanos vasculares, como Jacobson y Donaghy, recomiendan el uso del microscopio quirúrgico para reparar vasos de menos de 3 mm y pasa al campo neuroquirúrgico cuando Yasargil aprende esta técnica en Vermont pocos años mas tarde. El subsiguiente desarrollo se produce gracias a la mejora del material óptico, quirúrgico y, sobre todo, del material de sutura.

## II. ANATOMIA MICROQUIRURGICA

La arteria carótida común es el substrato vascular que más frecuentemente se emplea en microcirugía vascular. Otros vasos, como los femorales, se suelen abordar para la colocación de catéteres para medida de presión, recogida de muestras o administración de fármacos. La arteria aorta abdominal tiene un diámetro mayor que los vasos anteriores, y menos interés microquirúrgico. Finalmente, el corazón se aborda a cielo cerrado para recogida de sangre y a cielo abierto para la fijación 'in vivo'.

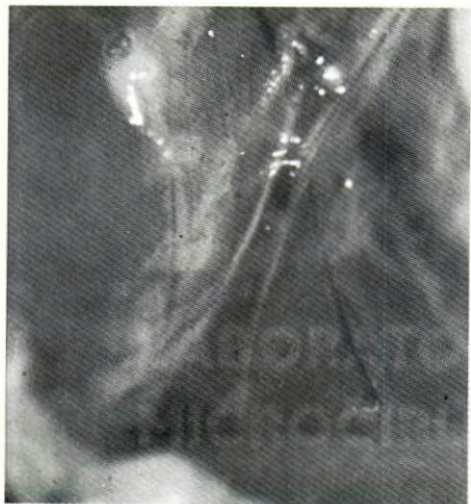
### A. Arteria Carótida Común y Yugular Externa

Una vez anestesiado el animal se coloca sobre una tabla de trabajo en decúbito supino, fijando con sendas tiras de esparadrapo las cuatro extremidades y la cola, de forma que la rata quede bien sujeta a la mesa. Se pasa entonces una seda fuerte por la base de los incisivos inferiores y se tira en sentido craneal, sujetando los cabos de nuevo a la mesa con esparadrapo. Seguidamente se rasura, o mejor se depila, la parte anterior del cuello. Se realiza entonces una incisión medial en la piel desde el borde inferior de la mandíbula hasta el esternón, que se continúa hacia el lado que se desee abordar, por encima de la clavícula. Se levanta de esta forma un colgajo cutáneo triangular, quedando debajo un tejido aponeurótico que cubre a las voluminosas glándula salivales submaxilares y sublinguales. Estas se levantan cuidadosamente con disección roma, ya que de lo contrario puede lesionarse alguna de las voluminosas venas afluentes de la yugular externa. El plano expuesto ahora muestra la musculatura paratraqueal y el esternocleidomastoideo formando un ángulo que se cierra cranealmente con el músculo digástrico, mientras que por fuera del esternocleidomastoideo corre la yugular externa.

La disección de la **vena yugular** puede completarse ahora cuidadosamente, ya que dicha vena aparece muy ancha, pero por estar aplastada contra el plano profundo por la posición del animal. Se aprecia cómo dicho vaso recibe proximalmente múltiples afluentes y cómo se pierde por debajo de la clavícula en la caja torácica, que le transmite los movimientos respiratorios. Las aferencias a la yugular externa proceden del territorio facial y craneal a través de la vena facial y otras (Figura 4-1).

Para abordar la **arteria carótida común** se abre el triángulo anteriormente descrito pasando una sutura por debajo del músculo esternocleidomastoideo, de forma que es rechazado hacia afuera. La musculatura paratraqueal es mejor no manipularla (salvo si se va a hacer una traqueotomía), para evitar irritar la tráquea y aumentar peligrosamente las secreciones con el consiguiente problema respiratorio mecánico. Separado el músculo esternocleidomastoideo se aprecia ya el latido de la arteria, cubierta por el músculo omohioideo, de disposición muy ancha en la rata. Este músculo debe ser seccionado, con





**Figura 4-1.-** Vena yugular externa izquierda. Se aprecia cómo se dilata cerca de la clavícula y cómo recibe sus aferencias cranealmente.



**Figura 4-2.-** Arteria carótida primitiva derecha. Se aprecia a la izquierda la bifurcación carotídea, con el nervio hipogloso cruzando por encima y el vago acercándose. Por debajo corre la cadena simpática cervical. La fotografía de la derecha muestra la carótida común, disecada proximalmente y con el nervio vago entrando en relación con la arteria.



lo que se libera la arteria, rodeada de un tenue plexo venoso y de finos filetes nerviosos, uno de ellos el nervio vago y con adherencias de su vaina aponeurótica. Todas estas estructuras y adherencias deben liberarse con disección roma manejando directamente la adventicia de la arteria, pudiendo dejar la arteria completamente pelada y libre desde la salida del tórax hasta su bifurcación, justo debajo del músculo digástrico y del nervio hipogloso (Figura 4-2). Es frecuente encontrar en esta topografía un voluminoso ganglio linfático por debajo del omohioideo. La vena yugular interna es muy pequeña y acompaña a la carótida desde su salida a través del agujero rasgado posterior. La longitud y diámetro del vaso están en relación con el peso del animal, pero en la rata de 225-250 g la longitud es de unos 1.5-2 cm y el diámetro de 0.8-1.2 mm. La disección más craneal de las ramas interna y externa de la carótida supone la sección del músculo digástrico. Por debajo del plano vascular queda la musculatura prevertebral, por donde corre el tronco simpático cervical. Se pasa entonces una tira de guante quirúrgico por debajo de la arteria, que se encuentra dispuesta para ser manipulada.

## **B. Arteria y Vena Femorales**

El animal se coloca sobre la tabla quirúrgica de la misma forma que la descrita en el apartado anterior. Se procede a rasurar o depilar la ingle del lado que se desee abordar. La incisión es longitudinal, comenzando por encima de la arcada inguinal y llevándola unos centímetros distalmente por el eje de la pierna. En la planificación de la incisión ayuda colocar la pata de la rata bien extendida y rotada hacia fuera, así como la palpación de la zona, que permite reconocer fácilmente el latido de la arteria femoral. Completada la incisión se retraen los bordes y se busca la arcada inguinal, por donde corren la arteria circunfleja ilíaca superficial y sus venas satélites hasta llegar al paquete femoral. Estos vasos que pueden excluirse con coagulación bipolar. Proximalmente a la desembocadura de los vasos circunflejos y rechazando hacia arriba la musculatura abdominal se identifica el paquete vasculonervioso femoral, envuelto en una firme aponeurosis (Figura 4-3). La arteria corre luego distalmente junto a su vena satélite y el nervio safeno (rama terminal del nervio femoral). Con las microtijeras puede abrirse longitudinalmente la aponeurosis, separando en primer lugar el nervio para proceder luego a separar con disección roma la arteria de la vena. Esta disección puede llevarse distalmente cuanto se desee, mientras que proximalmente debe terminar en el ligamento inguinal.

La arteria femoral, debido a su gran componente muscular, se espasmódica con facilidad, por lo que su manejo debe ser muy cuidadoso o, si no interfiere con la experiencia, puede usarse tópicamente un vasodilatador como la papaverina. La vena femoral tiene unas paredes muy delicadas y su manejo debe evitarse para evitar su desgarramiento. La parte más manejable del paquete es el nervio safeno, aunque puede ser dolorosa para el animal y por ello es conveniente aplicar tópicamente unas gotas de anestesia local.



### **C. Arteria Aorta Abdominal**

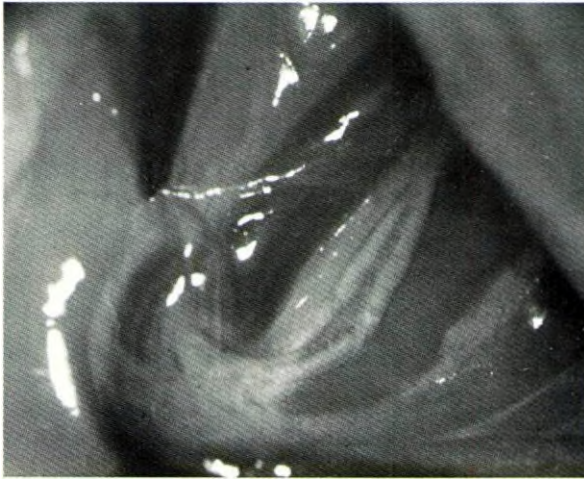
El animal se coloca de la forma que se ha descrito mas arriba y se rasura la región abdominal. Se realiza una incisión medial longitudinal desde la apófisis xifoides hasta la región púbica. Separada la piel se descubre un rafe aponeurótico medial que se incinde siguiendo toda su longitud, de forma que no se produce ninguna pérdida hemática. La pared abdominal es muy delgada a este nivel y se encuentra distendida por las asas intestinales. El paquete abdominal se extrae y rechaza hacia el lado izquierdo, envolviendolo en gasas humedecidas con suero templado para evitar su desecación. Se coloca entonces un separador automático o se separan los bordes de la herida con puntos de seda. Inmediatamente se aprecia el espacio retroperitoneal, siendo bien evidentes ambos riñones con sus vasos aferentes y, en la línea media, la arteria aorta y vena cava ascendente, con sus colaterales y afluentes. En orden descendente las ramas mas importantes de la aorta son la celiaca, mesentérica anterior o superior, renal derecha, renal izquierda, arterias gonadales y mesentérica posterior o inferior, mientras que a diferentes niveles emergen las arterias lumbares e iliolumbares. Distalmente, por debajo de la vejiga, se aprecian los vasos ilíacos.

El espacio retroperitoneal por donde corren los vasos es muy rico en grasa, por lo que en animales grandes su disección es mas compleja. La arteria corre por el lado izquierdo y la vena, intensamente azul, por el lado derecho y en un plano discretamente mas anterior (Figura 4-4). Ambas estructuras muestran abundantes adherencias, ya que la adventicia es común, por lo que debido a la extrema fragilidad de la pared de la cava, la lesión de esta última es extremadamente fácil y siempre hay que usar disección roma. Para movilizar un segmento amplio de la arteria aorta es necesario ir coagulando sus ramas lumbares.

### **D. Corazón**

El acceso quirúrgico a cielo abierto al corazón se hace a través de un abordaje toraco-abdominal, una vez colocado el animal de la forma descrita anteriormente. Se identifica la apófisis xifoides y se aísla la misma a través de una incisión medial infraxifoidea, para rodearla con un hilo del que se tira distalmente. Se abre entonces el tórax por la unión costodiafragmática en ambos lados y se extirpa posteriormente la cara anterior de la pared torácica en sentido ascendente hasta la unión esternoclavicular. Quedan entonces los pulmones retraídos y el corazón cubierto en su mitad superior por el voluminoso timo. La aurícula derecha se identifica fácilmente, mientras que la punta del corazón corresponde al ventrículo izquierdo (Figura 4-5).

El acceso a cielo cerrado se hace con el animal anestesiado y colocado en decúbito supino. Se palpa entonces la apófisis xifoides y se introduce la aguja por debajo de ella, en sentido ascendente y paralela a la pared torácica. La punción del corazón se reconoce por el latido que transmite a la aguja.



**Figura 4-3.-** Paquete femoral. Fotografía tomada entre el pliegue inguinal y la salida del paquete de las circunflejas, una vez liberados los elementos de la aponeurosis femoral. Se aprecia la voluminosa vena, la arteria a su lado y más medialmente el nervio femoral, con sus dos ramas, la muscular y el safeno.



**Figura 4-4.-** Arteria aorta abdominal y vena cava ascendente. Se aprecia cómo están envueltas en una aponeurosis común y las voluminosas venas iliolumbares.



**Figura 4-5.-** Corazón. Se ha abierto el tórax ampliamente y se observan los pulmones retraídos, la aurícula derecha de aspecto más oscuro y el ventrículo derecho con la circulación coronaria. La tenue lámina inferior corresponde al pericardio.



### III. TECNICAS DE MICROCIURUGIA VASCULAR

La microcirugía vascular implica conocer una serie de detalles técnicos comunes para cualquier técnica que quiera realizarse, concretamente el manejo de la adventicia y de la luz vascular, las técnicas de exclusión y reperfusión vascular, material de microcirugía y técnicas de reparación.

La adventicia es la capa mas superficial de la pared vascular, formada por varias capas de tejido conectivo laxo y que contiene la vascularización e inervación parietal. En cualquier técnica de microcirugía vascular es prioritario la extirpación de la adventicia de la zona donde se vaya a trabajar. La principal razón de ello es evitar que fragmentos de adventicia se introduzcan en el interior de la luz vascular favoreciendo la trombosis. Desde un punto de vista técnico la adventicia también dificulta la identificación de los bordes de la pared vascular y el deslizamiento de los puntos de sutura. Sin embargo, la extirpación de la adventicia debe ser respetuosa con la pared vascular, ya que una excesiva manipulación de la pared conduce a su traumatismo. En las anastomosis la adventicectomía se hace con la técnica del 'milking', estirando suavemente de la adventicia hacia adelante, para ir cortándola, con lo que una vez retraída deja el borde de la luz libre de la misma. La extirpación de la adventicia es particularmente difícil, y al mismo tiempo necesaria, en la reparación de las venas.

En la manipulación de los vasos siempre se pinza la adventicia, evitando introducir instrumentos en la luz vascular que lesionan la íntima y favorecen la trombosis. Aun así, cuando se realiza una sección vascular los bordes pueden quedar adheridos, y para separarlos se coloca en su interior la punta de las pinzas de microcirugía abriendolas cuidadosamente. En todos los casos la luz del vaso se lava con suero fisiológico heparinizado.

La exclusión de la circulación se hace aplicando dos microclips vasculares en la porción proximal y distal de la zona de trabajo. Cuando se procede a la sección de la arteria excluida se produce una importante retracción de los cabos vasculares. Por ello los clips deben ir montados sobre una barra que posteriormente permita aproximar los extremos del vaso sin que exista tensión a nivel de la sutura. Cuando en la reparación no vaya a influir la tensión los clips pueden ser sencillos. La presión de los clips debe ser suave, ya que de lo contrario se produce la lesión del vaso al nivel donde se han aplicado. Cuando termina la reparación se repone la circulación abriendo de nuevo los clips, siendo aconsejable empezar por el distal. Durante unos segundos puede producirse una pérdida hemática a nivel de la sutura, que se previene rodeandola con una pequeña tira de material hemostático (Surgicel) o presionando suavemente sobre la sutura con una torunda.

El material de microcirugía necesario para la reparación vascular es muy elemental:

- dos pinzas de relojero del n.5, utilizándose una de ellas como portaagujas,
- una microtijera corta
- varios microclips, al menos dos de ellos montados para poder ser deslizados sobre una barra o en un aproximador.



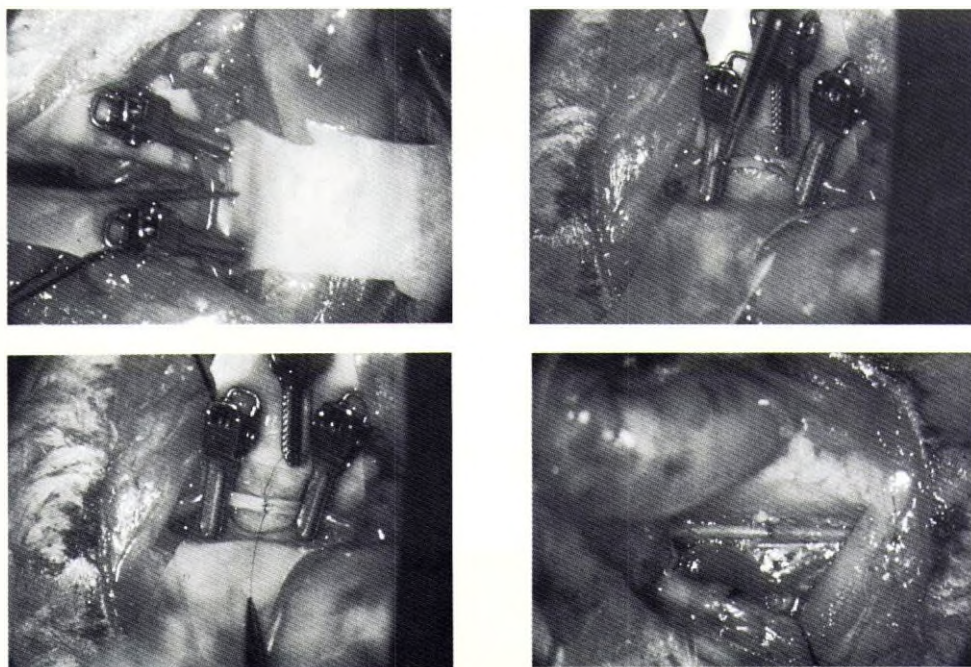
Dentro de las técnicas de reparación vascular la que presenta mas interés por su versatilidad y resultados es la microsutura. Otras técnicas sin interés actual son el uso de adhesivos, aparatos de microsutura, electrocoaptación y sutura ayudada con laser. El material de microsutura actual se basa en agujas atraumáticas redondas, de calibre constante que se continúa con el hilo, que generalmente es de nylon. El mejor material de sutura es el hilo de 10/0 con aguja atraumática (Ethilon 10/0, poliamida monofilamento montada en aguja curva de cuerpo redondo y con un diámetro de 130  $\mu$ ). La sutura mas recomendable es la realizada con puntos sueltos, ya que la sutura continua favorece la estenosis y dificulta la expansión posterior de la luz del vaso a ese nivel. Para ello se pasa la aguja a través de la pared de un extremo, saliendo por la luz del vaso, y se vuelve a pasar, ahora desde la luz al exterior, por el otro extremo. Al deslizar el hilo debe cuidarse de no desgarrar la pared y el nudo debe ser suave, siendo suficientes dos o tres, siempre en sentido contrario. La distancia entre los puntos debe ser regular, de unos 0.5 mm.

### A. Sutura Arterial

Existen diversas técnicas de reparación arterial, que comprenden: reparación de arteriotomía longitudinal, anastomosis e injertos vasculares.

El ejercicio más sencillo es realizar y reparar una **arteriotomía longitudinal**. Para ello, una vez aislada la arteria, se libera la adventicia de la cara superior y se realiza una incisión longitudinal con unas microtijeras. Se lava la luz del vaso para limpiarla de sangre y se procede a la sutura con puntos sueltos. También puede crearse un defecto parietal, resecaando una zona ovalada de la pared de la arteria. En este caso se toma una porción de vena o arteria obtenida de una rata dadora, que se sutura al defecto. En la colocación de parches se recordará orientar el lado endotelial del injerto hacia la luz de la arteria; recortar el injerto de forma que ajuste en el defecto y colocar inicialmente cuatro puntos equidistantes, complementando luego la sutura simétricamente.

Más interés tiene la anastomosis vascular. En la **sutura termino-terminal** (Figura 4-6) se prepara la arteria de la forma expuesta y se secciona transversalmente. Se retira luego la adventicia con la técnica del 'milking' y se aproximan los bordes a suturar acercando los microclips. Para realizar la sutura se usa la técnica de la triangulación de Carrel, que se basa en la colocación inicial de tres puntos equidistantes. Los dos primeros son fáciles, mientras que para el tercero se precisa voltear la arteria. Esto se consigue manipulando los microclips y su soporte o, más burdamente, dejando los hilos de los dos primeros puntos largos y procediendo a tirar de ellos rotando la arteria hasta ver su cara inferior. Luego se colocan otros dos puntos en los defectos que quedan entre los puntos iniciales, que suelen ser suficientes para completar la anastomosis de un vaso de hasta 1.2 mm. Para la **sutura termino-lateral** se prepara una arteriotomía en la arteria receptora donde se aboca la dadora. Inicialmente se colocan los puntos extremos proximal y distal y luego los laterales,



*Figura 4-6.- Sutura arterial terminoterminal de la arteria carótida común. Las fotografías muestran los principales pasos de la técnica: sección transversal del vaso diseccionado y excluido con dos clips; realización de la sutura de la cara anterior; sutura completada; vaso permeable tras retirar los clips.*

para aplicar entonces uno o dos puntos entre los anteriores. La inclinación deseable entre ambos vasos es de unos  $45^{\circ}$ , por lo que el vaso dador debe ser cortado con esta inclinación y el orificio de la arteria receptora será ovalado. Otra técnica es la anastomosis laterolateral, practicando sendas arteriotomías ovales en dos arterias cercanas.

Finalmente se pueden colocar **injertos terminoterminales, lateroterminales o laterolaterales**, sobre una misma arteria o entre dos arterias. En este caso se emplean arterias de ratas dadoras, que conviene implantar inmediatamente después de su extracción, ya que si se mantienen largo tiempo en suero suelen perder elasticidad y consistencia (Figura 4-7).

## B. Sutura Venosa

La sutura venosa es particularmente más difícil que la arterial. Ello se debe a varias razones: la pared es menos elástica, con lo que se pegan las caras del vaso siendo más difícil identificar la luz; la adventicia más adherente y difícil de resecar; las paredes son



más débiles y se desgarran con más facilidad; el flujo es más lento favoreciendo la trombosis. A pesar de ello los detalles técnicos de la sutura venosa no son diferentes de los referidos para las arterias.

### **C. Fístula Arteriovenosa**

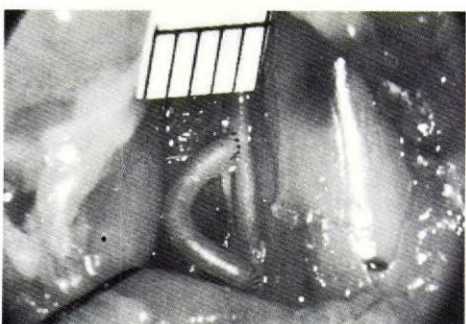
La anastomosis entre una arteria y una vena vecina puede hacerse mediante diversos montajes (anastomosis latero-lateral, termino-lateral, injerto interpuesto en H) (Figura 4-8).

### **D. Aneurismas**

Existen diversas formas de conseguir el desarrollo de aneurismas experimentales. A nivel intracraneal se inducen mediante aumento de la presión arterial (mediante ligadura de la rama posterior de ambas arterias renales o en ratas espontáneamente hipertensas SHR) combinada con alimentación rica en sal (ingestión como agua de bebida de una solución de ClNa al 0.1%) y, eventualmente, asociando la ligadura de la carótida común o la sutura termino-lateral carótido-carotídea o inducción de latirismo tóxico. A nivel extracraneal hay dos técnicas microquirúrgicas de interés. Puede realizarse una arteriotomía reparada con un pequeño segmento de vena suturado termino-lateralmente y con su extremo distal ligado. Otra técnica consiste en la realización de una arteriotomía en la bifurcación carotídea y, a través de ella, reseca en la cara opuesta de la pared vascular una pequeña porción de íntima, elástica interna y parte de la media.

### **E. Colocación de Catéteres Crónicos**

La colocación de catéteres intravasculares tiene interés para la medida de la presión arterial, administración de drogas o contrastes u obtención de muestras sanguíneas. Una vez aislado el vaso que se quiera se pasan por debajo dos hilos de seda de 4/0 separados unos 5-10 mm. Luego se tira suavemente de ellos para excluir la circulación y se realiza una pequeña incisión en la pared, a través de la que se introduce el catéter de calibre adecuado y relleno de suero fisiológico heparinizado. El catéter se avanza más allá de la sutura correspondiente y posteriormente se anuda teniendo cuidado de no ocluir su luz. Finalmente se procede a ligar la otra sutura, con lo que se ocluye la luz del vaso. Ocasionalmente es posible canalizar un vaso pequeño con un sistema de Abbocath del número 25. Para ello se prepara el vaso de la forma descrita y se punza con la aguja observando como sale sangre por su extremo, deslizando suavemente la funda dentro de la luz del vaso. El propio vasoespasmo acopla la pared vascular alrededor del catéter y no es necesario excluir de la



*Figura 4-7.- Sutura terminolateral doble con injerto, mostrando los principales pasos de la técnica.*



*Figura 4-8.- Fístula carótido-yugular, realizada con la interposición de un injerto de carótida procedente de otra rata dadora.*



circulación el vaso canalizado. El mantenimiento de estas vías supone lavarlas frecuentemente con suero fisiológico heparinizado y cuidar de que no hagan pared.

### III. VALORACION DE LAS TECNICAS

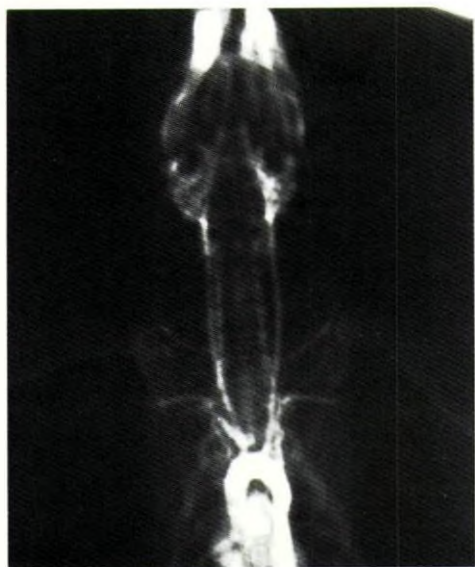
#### A. Arteriografía

Es el método mas sencillo de valorar la reparación vascular realizada. Los resultados se cuantifican contando el porcentaje de vasos permeables y se valora, en los vasos permeables, el grado de estenosis en porcentaje de luz ocluida. Para la arteriografía carotídea se canaliza la aorta abdominal introduciendo un catéter unos 7-8 cm hasta colocarlo en el arco aórtico. Se inyecta entonces un volumen de 0.5-0.8 ml de contraste radiológico y se hace un único disparo centrado en la región a estudiar. Puede usarse un equipo radiológico convencional de foco fino o de mamografía (Figura 4-9).

#### B. Medida del Flujo

La medida del flujo sanguíneo es otra forma de conocer el resultado de la reparación microvascular. La exploración de la anastomosis estudiando el paso de sangre a través de la misma es el mejor test para conocer el resultado inicial de la reparación. La simple inspección bajo el microscopio quirúrgico observando la turgencia y latido del vaso son orientativos. Más interesante es el **test de oclusión**, que permite además reconocer la existencia de fugas a través de los puntos de sutura. Para ello se clipa el vaso proximalmente a la zona reparada y luego se coloca una pinza que cierra el flujo distalmente, desplazándola unos milímetros de forma que vamos exprimiendo el contenido del vaso. Inmediatamente después abrimos el paso liberando el clamp proximal, con lo que la zona vaciada se llena de sangre hinchando la zona reparada y señalando la permeabilidad de la sutura. Finalmente, se libera la pinza distal para normalizar el flujo.

La **ultrasonografía doppler** se basa en el cambio en la frecuencia que sufre un sonido cuando el transmisor, receptor o el objeto reflectante del sonido se alejan o acercan uno del otro. El cambio de frecuencia es proporcional a la velocidad del movimiento, por lo que puede calcularse la dirección y velocidad de la sangre determinando la diferencia de frecuencia entre el sonido transmitido y el recibido. La sonda de tamaño adecuado se aplica sobre el vaso en el punto deseado con un ángulo de unos 50°. También es útil la **fluximetría electromagnética** (Skalar electromagnetic flowmeters, Holanda), que precisa la colocación de una cabeza que rodea el vaso cuyo flujo se pretende medir. Estas cabezas son de diferentes tamaños (desde 0.5 mm de diámetro) y debe seleccionarse la adecuada para el



**Figura 4-9.-** Arteriografía de control mostrando la permeabilidad de una sutura terminoterminal (arriba), injerto laterolateral doble (arriba derecha) y de una fístula carotido-yugular (izquierda).



vaso que se quiera estudiar. Así como la ultrasonografía mide la velocidad del flujo, la fluximetría mide directamente el flujo. Una ventaja adicional es que las sondas de fluximetría pueden dejarse crónicamente implantadas para medidas repetidas.

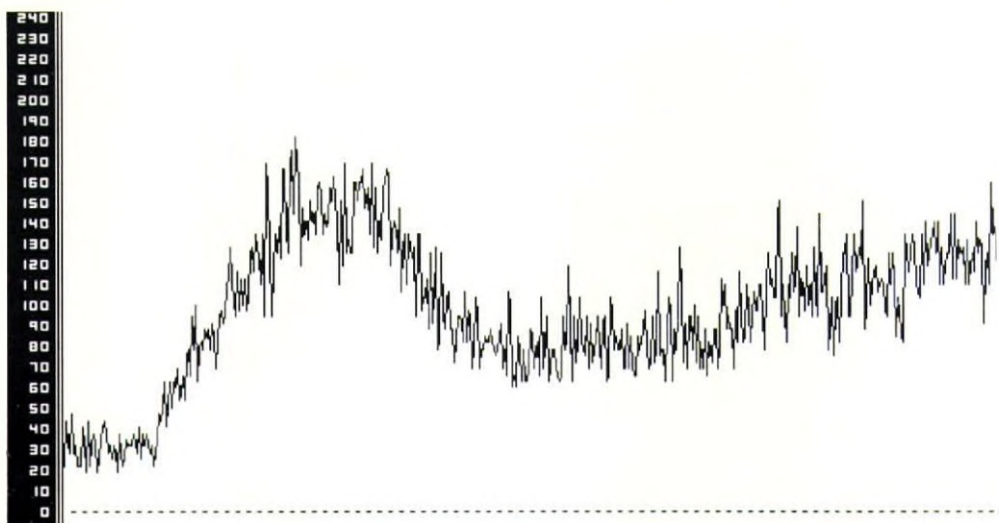
Finalmente, es posible medir distalmente el flujo tisular en el territorio servido por el vaso reparado mediante el **doppler laser**, que se basa en un principio físico semejante al de la ultrasonografía doppler, pero utilizando ahora la luz monocromática generada por un laser He-Ne de 632.8  $\mu$  (Periflux PF3 laser doppler, Perimed, Suecia). La medida se hace colocando el extremo de la sonda sobre la piel o implantándola en el seno del tejido a estudiar. Permite registros agudo y crónicos, pero mide el flujo en unidades convencionales (unidades de perfusión), por lo que sólo son posibles estudios comparativos de incremento o reducción de flujo. En este sentido son interesantes los test de hiperemia reactiva a la oclusión vascular y el test de vasodilatación por calentamiento de la piel en el punto de medida (Figura 4-10).

### C. Técnicas Histológicas

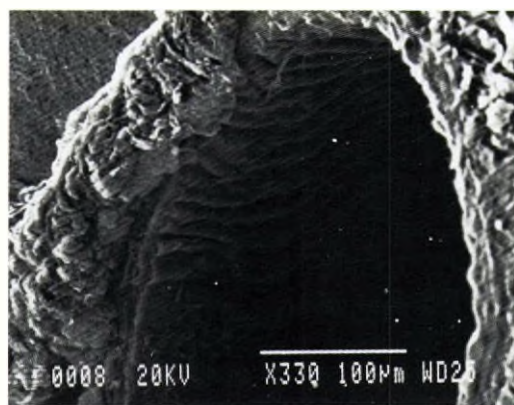
En la valoración de las técnicas de reparación vascular fue usada ampliamente la **microscopia electrónica de barrido**, que permite visualizar estereoscópicamente la superficie endotelial (Figura 4-11). Para el procesado se realiza una fijación 'in vivo' con glutaraldehído, siendo procesadas las piezas mediante un secado en punto crítico seguido de la pulverización con oro. En condiciones normales se aprecian pliegues y ondulaciones de la superficie endotelial que siguen una dirección longitudinal, siguiendo la dirección del vaso, sobre las que pueden distinguirse los abultamientos de los núcleos de las células endoteliales. Estas ondulaciones son más estrechas en las venas que en las arterias. La inmersión de los vasos en EDTA 0.1M durante una hora elimina el endotelio y puede observarse la lámina elástica interna, que es en definitiva la responsable de las ondulaciones descritas. La elástica interna de las arterias es más densa que la de las venas, mientras que en estas últimas la red es menos tupida y deja entre las fibras espacios con abundante cantidad de fibras colágenas.

Cuando se observa una porción sometida al trauma de los microclips se aprecia la pérdida de las ondulaciones con formación de pliegues irregulares y zonas de lesión endotelial con fibrina y eritrocitos aplastados. La intensidad de la lesión está en relación directa con la presión ejercida por el microclip. Los cambios en zonas de sutura también son inespecíficos, con estenosis, roturas endoteliales, pliegues y acúmulo de células y fibrina en los puntos de paso de la aguja y línea de sutura. Estos cambios condicionan una serie de problemas. La exposición de colágeno activa el depósito de plaquetas, que se aplanan formando un pseudoendotelio. Durante esta transformación las plaquetas se degranulan activando la agregación plaquetaria y la formación de un trombo mural, ya presente en unos 15-30 minutos y que se va lisando en los próximos días conforme se

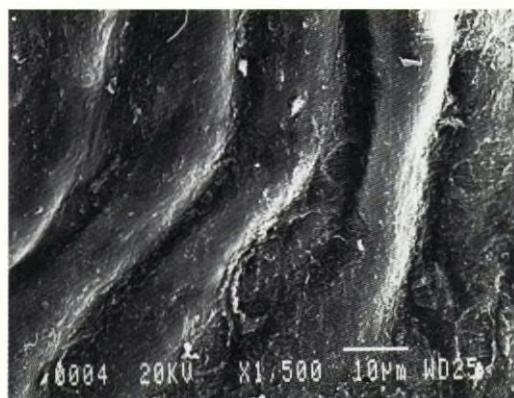


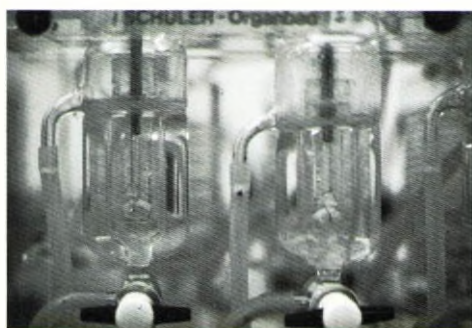
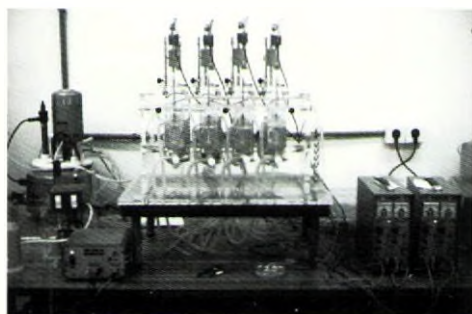


**Figura 4-10.-** Medida con Laser Doppler del flujo cutáneo en la cara plantar de la pata posterior de la rata. Test de hiperemia reactiva al calentamiento cutáneo, con un calentamiento a 42 °C durante 60 segundos. Se aprecia como el flujo aumenta reflejante al calentamiento de la piel y, tras finalizar el mismo, se mantiene por encima de los valores previos.



**Figura 4-11.-** Fotografías con microscopía de barrido de un corte de la arteria carótida de la rata, apreciándose las capas que constituyen la pared y las ondulaciones longitudinales de su superficie interna (arriba). En la fotografía inferior se recoge un detalle de las ondulaciones.





*Figura 4-12.- Baño de órganos. Imagen general del equipo y detalle de dos de los pocillos donde se hallan montadas las arterias.*

produce la re-endotelización. La pérdida de la lisura de la pared arterial en las zonas de reparación conduce a que el flujo vascular laminar normal se convierta en turbulento, lo que favorece el depósito plaquetario y la trombosis.

La histología convencional es de más difícil valoración al perderse más fácilmente la orientación en los cortes.

#### **D. Estudios 'in vitro'**

Desde un punto de vista farmacológico tiene interés el estudio de la actividad vasomotora de los vasos y su respuesta a los fármacos. La mejor forma de estudiar estos hechos es en un baño de órganos con el vaso aislado (Figura 4-12). Para ello es necesario obtener el vaso y despojarlo, bajo microscopio quirúrgico, de la adventicia en un recipiente lleno de solución de Krebs oxigenada. Posteriormente se monta en unos alambres y se somete a una tracción por contrapesos, recogiéndose la actividad motora del mismo mediante transductores isotónicos o isométricos. El vaso está en todo momento montado en un pocillo lleno de solución de Krebs oxigenada, en el que se añaden las drogas con actividad vasomotora. El objetivo del estudio es obtener unas curvas dosis-efecto, añadiendo al pocillo soluciones de concentración creciente de la droga. Mediante un cálculo matemático se halla la concentración que produce la respuesta del 50% (EC-50) y posteriormente la potencia de cada droga, definida como el logaritmo negativo de la EC-50 ( $pD_2 = -\log EC-50$ ).

## REFERENCIAS

- Alvarez F, Roda JM. Experimental model for induction of cerebral aneurysms in rats. *J Neurosurg* 65: 398-400, 1986.
- Donaghy RMP, Yasargil MG (eds). *Microvascular Surgery*. Stuttgart. Georg Thieme Verlag, 1967.
- Gil-Salú JL. *Efecto de la Estimulación Medular sobre el Tono Vasomotor y la Reactividad Vascular. Estudio Experimental*. Tesis Doctoral. Facultad de Medicina. Universidad de Cádiz. 1991
- Gilsbach JM. *Intraoperative Doppler Sonography in Neurosurgery*. Wien-New York. Springer Verlag, 1983.
- González-Darder JM, Segura D, Cerdá-Nicolás M, Broseta J. Transplante intraventricular de epiplon en el tratamiento de la hidrocefalia no comunicante. Estudio experimental. *Cir Esp* 34: 327-329, 1983.
- Gregorius FK. Applications of scanning electron microscopy to microvascular surgery. En Rand W (ed): *Microneurosurgery*, 3 ed. St Louis-Toronto-Princeton. CV Mosby Co, 1985. pp 621-633.
- Kamphorst W, Yong-Zhong G, van Alphen HAM. Pathological changes in experimental saccular aneurysms in the carotid artery of the rat. *Neurol Res* 13: 55-59; 1991.
- Morales-Ramos F. *Técnica microquirúrgica. Guía para su aprendizaje*. Sevilla. Pecuatro, 1980.
- Schmiedek P, Gratzl O, Spetzler RF. *Microsurgery for Stroke*. New York-Heidelberg-Berlin. Springer Verlag, 1977. pp 105-138.
- Vaquero C, González-Perea J, Rodríguez-Toves, Diago M<sup>a</sup>V<sup>a</sup>, Verrier A. *Manual de Microcirugía Experimental en la Rata*. Valladolid. Secretariado de Publicaciones Universidad de Valladolid, 1988.
- Yasargil MG. Experimental microsurgical operations in animals. En Yasargil MG (ed): *Microsurgery. Applied to Neurosurgery*. Stuttgart. Georg Thieme Verlag, 1969. pp 60-81.





# 5

## TECNICAS SOBRE LOS NERVIOS PERIFERICOS

---

- I. Introducción
  - II. Estructura Histológica y Anatomía Microquirúrgica
    - A. Estructura Histológica
    - B. Anatomía Microquirúrgica
    - C. Morfometría del Nervio Ciático
  - III. Técnicas de Microcirugía Nerviosa
    - A. Técnicas de Reparación Nerviosa
    - B. Modelos para Estudio de la Regeneración Nerviosa
    - C. Modelos para Estudio del Dolor por Lesión del Sistema Nervioso Periférico
  - IV. Valoración de las Técnicas
    - A. Valoración de la Lesión Neurológica
    - B. Técnicas Histológicas
    - C. Técnicas Neurofisiológicas
-





## **I. INTRODUCCION**

El desarrollo y la implantación de las técnicas microquirúrgicas sobre el Sistema Nervioso Periférico obligan a conocer y familiarizarse con la anatomía macro y microscópica del animal de experimentación, en nuestro caso la rata albina. En la exposición del presente capítulo repasaremos la anatomía básica, técnicas usuales y haremos algunas consideraciones acerca de las técnicas histofisiológicas empleadas a nivel experimental en el estudio de las consecuencias de la cirugía sobre los nervios periféricos

## **II. ESTRUCTURA HISTOLOGICA Y ANATOMIA MICROQUIRURGICA**

El Sistema Nervioso Periférico está constituido básicamente por los nervios, ganglios y las terminaciones nerviosas.

### **A. Estructura Histológica**

En la composición de un nervio periférico hemos de considerar diversos elementos, concretamente el cilindro-eje o axón, que es la prolongación emitida por una célula nerviosa, y las vainas de recubrimiento, de naturaleza celular (citoplasma de las células de Schwann) o lipoproteica (mielina, formada a expensas de la envoltura repetida de la membrana de la célula de Schwann). Esto es lo que nos permiten dividir a las fibras nerviosas en mielínicas y amielínicas. Las fibras mielínicas tienen una vaina de mielina y son de topografía periférica (en el nervio) o central (en la sustancia blanca). Las fibras amielínicas carecen de vaina de mielina y generalmente están agrupadas en el citoplasma de una célula de Schwann (en el nervio) o libres (terminaciones nerviosas).

Funcionalmente las fibras nerviosas se dividen según la existencia o no de mielina, grosor de la fibra y velocidad de conducción, considerándose los siguientes tipos:

Tipo A: fibras mielínicas gruesas (5-20 micras) y de conducción rápida (10-120 m/s). Son fibras motoras y sensitivas somáticas.

Tipo B: fibras mielínicas de diámetro menor de 5 micras y de velocidad de conducción entre 2-15 m/s. Son fibras mayormente vegetativas.

Tipo C: fibras amielínicas de calibre mínimo y con velocidad de conducción inferior a 2 m/s. Son fibras vegetativas y sobre todo sensitivas, transmisoras de impulsos sensitivos procedentes de receptores de alto umbral.

La fibra nerviosa discurre a su vez inmersa en un tejido conectivo que la soporta y le proporciona una unidad anatómica, siendo en realidad quien nos permite actuar quirúrgicamente sobre el nervio periférico. El elemento que rodea a cada fibra nerviosa y sin solución de continuidad constituye un entramado de tejido conjuntivo laxo que rellena los espacios libres, es el endoneuro. Un grupo de fibras nerviosas constituye un fascículo nervioso, que se encuentra envuelta por el perineuro, más duro y rico en fibras colágenas y dispuestas perpendicularmente al eje longitudinal del nervio. El espacio interfascicular se encuentra relleno por un tejido conectivo laxo, por donde transcurren los vasos del sistema linfático y las arborizaciones vasculares del nervio, encontrándose todo ello agrupado gracias a un tejido conectivo abundante, con fibras colágenas longitudinales y que dotan al nervio de independencia macroscópica. A esta estructura se le conoce como epineuro (Figura 5-1).

## B. Anatomía Microquirúrgica

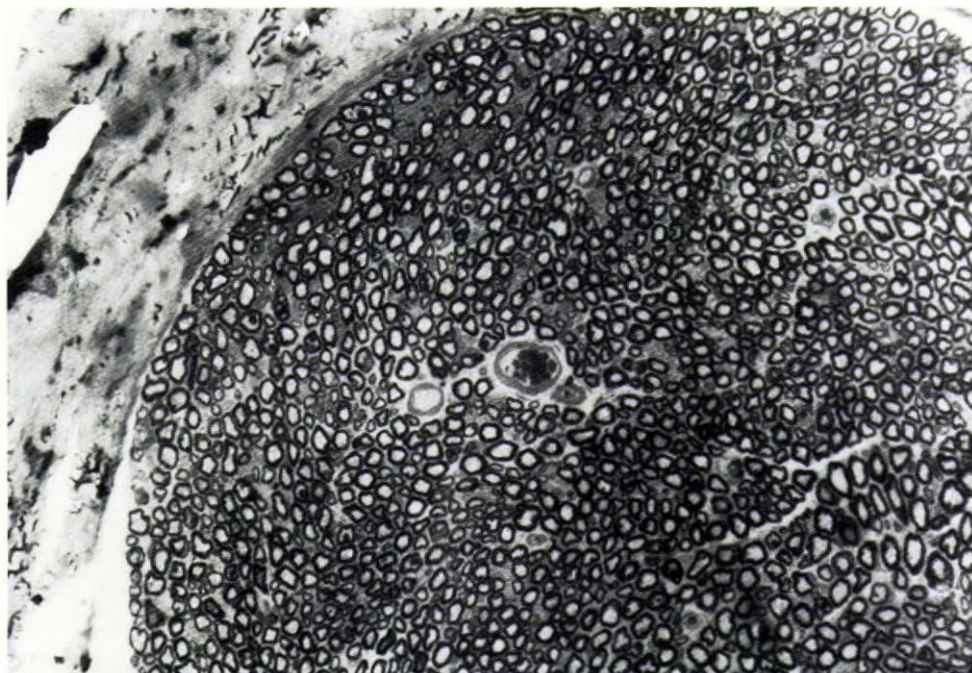
En la descripción de estas estructuras vamos a seguir a Greene (1983) y Waynforth (1980), haciendo especial hincapié en los plexos cervicobraquial y lumbosacro.

### B.1. Anatomía microquirúrgica del plexo cervicobraquial

Los nervios espinales consisten, en la rata albina, en 34 pares de nervios, 8 cervicales, 13 torácicos, 6 lumbares, 4 sacros y 3 caudales. Todos los ganglios de los nervios espinales se encuentran en el interior del canal vertebral, con excepción del segundo cervical. Las ramas anteriores de los cuatro primeros nervios cervicales y componentes del quinto cervical constituyen el **plexo cervical**, mientras que los cuatro últimos nervios cervicales, una gran parte del primer torácico y una pequeña parte del segundo torácico, constituyen el plexo braquial. Los nervios que forman el **plexo braquial** emergen a través del músculo escaleno, constituyendo el plexo en la axila. No existe en la rata albina, por la disposición aplanada de los nervios, la división en parte medial, lateral y posterior que se hace en el ser humano.

De la porción distal del plexo salen de la axila ya constituidos los diversos nervios periféricos, que en sentido cráneo-caudal, serían: cutáneo del cuello, auricular mayor y occipital menor (C3-C4), en sentido ascendente y atravesando el músculo omohioideo, cubierto por el músculo esternomastoideo hasta emerger por encima del hombro, y que se



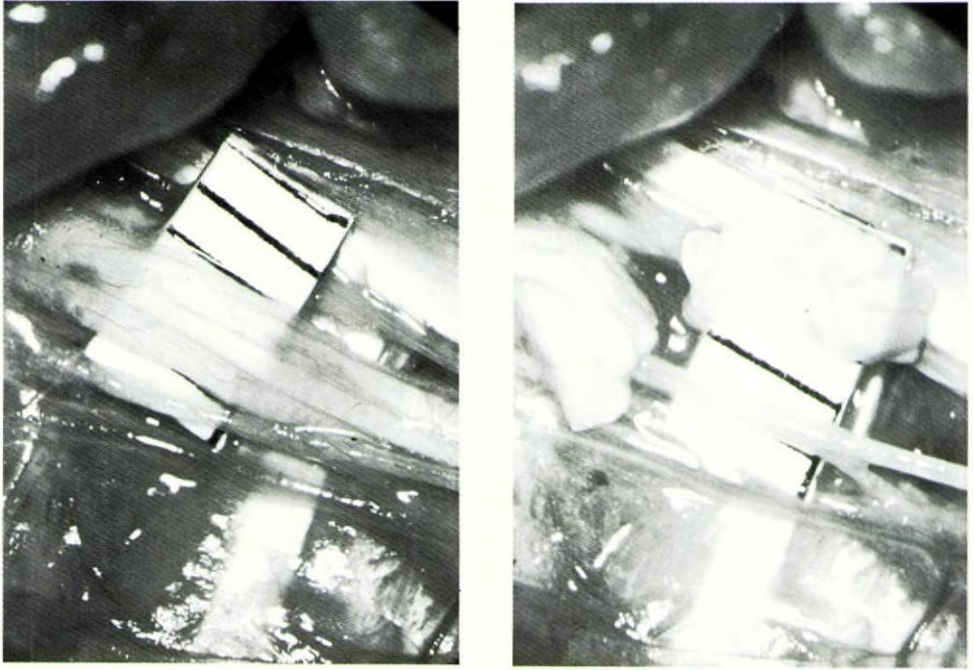


**Figura 5-1.-** Estructura del nervio ciático de la rata. Se aprecian los axones de diferentes calibres rodeados de la vaina de mielina. En algunas fibras se advierte el núcleo de la célula de Schwann que la rodea. Se observan bandas fibrosas que aislan grupos de fibras (semifino, azul de toluidina, x400).

acompañan de los nervios supraclaviculares anterior, posterior y medio (C3-C4-C5). Desde C4-C5 parten, escondiéndose bajo clavícula y el músculo pectoral mayor y apoyándose sobre el plano que les supone el músculo dorsal largo los nervios subclavio, supraescapular, subescapular superior, medio e inferior (C6 también) y pectoral mayor, así como ramas deltoideas y a la articulación del hombro.

La salida del plexo braquial de los principales ramos nerviosos que van a la extremidad delantera del animal se configura por encima de la arteria axilar (Figura 5-2), en la corredera que les supone la porción superoexterna del músculo dorsal largo, los pectorales mayor y menor y el músculo cutáneo mayor en su profundidad. De esta forma parten el nervio músculo-cutáneo (C4 a C7) a buscar la salida entre los músculo coracobraquial y porción corta de músculo bíceps braquial; el nervio musculoespinal o radial (C4 a C8), bajo el músculo dorsal largo, porción corta del bíceps braquial y músculo tríceps braquial; el nervio mediano (C4 a T1) que acompaña al nervio radial y arteria axilar en su salida; y el nervio ulnar (C4 a T1) que igualmente acompaña a los anteriores pero se dispone bajo la arteria axilar separándose del nervio mediano. Los ramos cortos e inferiores del plexo braquial los constituyen el nervio axilar o circunflejo, los torácicos





*Figura 5-2.- Plexo braquial. La estructura del plexo normal se aprecia en la fotografía de la izquierda, con los diferentes troncos junto a la arteria y vena axilares. En la fotografía de la derecha se muestra el plexo tras su sección, respetando las estructuras vasculares.*

dorsal lateral y medial anterior (C4 a T1). Por la porción medial e inferior de la axila, la abandonan el nervio frénico (C4-C5) y el nervio torácico largo (C6-C7-C8).

## **B.2. Anatomía microquirúrgica del plexo lumbosacro y de los nervios ciático y femoral**

El plexo lumbo-sacro conviene describirlo en dos partes, lumbar y sacro, aunque en ocasiones no encontremos claras líneas de demarcación entre ellos. A diferencia del plexo braquial, que presenta habitualmente pocas variaciones, el plexo lumbo-sacro varía considerablemente entre los distintos animales e incluso entre los de un mismo género. El plexo lumbo-sacro está formado por la unión de los ramos anteriores de los seis nervios lumbares y cinco sacros.

El **plexo lumbar** está formado por los primeros cuatro o cinco nervios lumbares y recibe a menudo fibras del 13º nervio torácico. De este plexo se configuran los nervios iliohipogástrico (T13-L1), ilio-inguinal (L1-L2), furcalis (L4), obturador (L2-L3-L4) y femoral (L2-L3-L4). Los dos primeros nervios atraviesan el músculo psoas oblicuamente

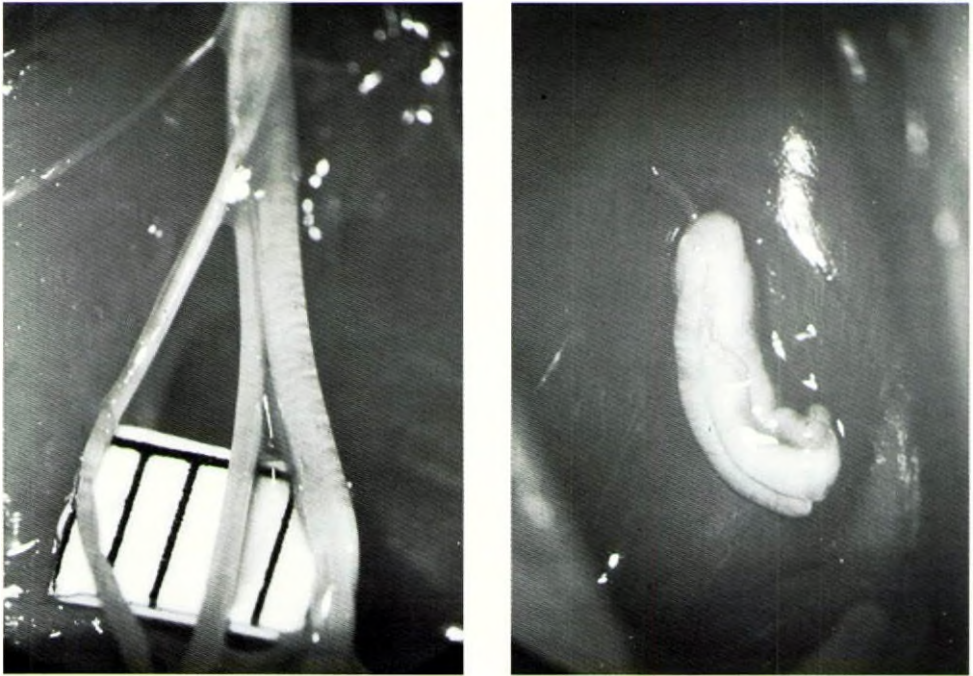
hasta su borde lateral para situarse entre el músculo cuadrado lumbar y el riñón o la pelvis respectivamente. El nervio obturador también atraviesa el músculo psoas en su porción inferior en la pelvis y acompaña la arteria hipogástrica. El nervio furcalis, atraviesa el proceso transversal de la 5ª vértebra lumbar y su porción principal se une al plexo sacro. El **nervio femoral** aparece entre músculo psoas menor y músculo ilíaco, atraviesa bajo el ligamento inguinal en compañía de los vasos ilíacos externos y antes de entrar en el muslo del miembro trasero se divide en una porción anterior y otra dorsal. La porción anterior constituye los ramos musculares a los músculos pectíneo e ilíaco. La porción posterior deja ramos nerviosos musculares al cuádriceps femoral, mientras que el resto de fibras constituyen el nervio safeno (safeno largo) que atraviesa superficialmente hacia abajo la porción medial del muslo y pierna, acompañándose de la arteria safena y vena safena larga.

El **plexo sacro** en la rata lo constituyen parte de L4 (nervio furcalis) y las raíces lumbares L5 y L6. Parte de sus fibras, mediante ramos comunicantes cortos, junto con el resto de nervios caudales constituirán el plexo pudendo. El plexo sacro proporciona dos grupos de fibras de diferente distribución respecto a su origen, pero se consolida en la pelvis como un tronco único o **nervio ciático**. Este nervio es divisible bajo disección en dos componentes principales terminales, los nervios tibial y común peroneal. El nervio ciático en la pelvis menor está separado del nervio pudendo por la arteria glútea superior. Conjuntamente profundizan hasta el borde dorsal del isquion y de la raíz de la cola. El nervio ciático entra al muslo a través de la porción caudal de la hendidura ciática, recorriéndolo hasta el hueco poplíteo, donde se divide en sus ramas terminales (Figura 5-3).

Desde un punto de vista de constitución anatómica se pueden considerar dos grupos de fibras diferentes según su origen, y que dan lugar a nervios diferentes:

- de la porción anterior o ventral del plexo sacro parten una serie de ramos terminales: nervio tibial, ramos musculares (a músculos de la corva, cuadrado femoral, gemelos, y obturador interno) y ramo articular a la cadera. De ellos, el **nervio tibial** (o poplíteo interno) es el de mayor interés quirúrgico. Se encuentra en su inicio cubierto por una envoltura común con el nervio común peroneal, pero bajo disección microquirúrgica pueden ser aislados proximalmente hasta su origen en el plexo. Anatómicamente, ambos de forma conjunta atraviesan el muslo, cruzan el músculo obturador externo, cuadrado femoral y adductor mayor estando cubiertos en su trayecto por el bíceps femoral hasta la fosa poplíteo. En la fosa poplíteo, el nervio tibial la atraviesa oblicuamente para descender a la pierna y atravesar la superficie medial de los vasos musculares superiores e introducirse entre las dos porciones del músculo gastrocnemius donde aporta ramos musculares. Sus últimos ramos descienden hasta la porción plantar de la pata del animal.
- de la porción posterior o dorsal del plexo sacro parten los siguientes nervios: **nervio común peroneal**, ramos musculares (a la porción anterior del





*Figura 5-3.- Nervio ciático, mostrando sus ramas terminales cutánea, sural, peroneana y tibial (izquierda) y el resultado de su sección (derecha).*

músculo bíceps, al piriforme, glúteo superior, glúteo inferior) y ramos articulares a la rodilla. El nervio común peroneal tiene un primer trayecto común al nervio tibial que ya ha sido descrito. A nivel del trocánter mayor da un ramo interno o **nervio sural** que accede a la piel de la cara interna del miembro trasero. El resto del nervio peroneal común atraviesa la fosa poplítea se coloca lateral a la arteria poplítea y entra en la porción inferior del miembro trasero, entre el bíceps femoral y la porción lateral superior del gastrocnemius. A diferencia del nervio tibial, estos nervios son fundamentalmente sensitivos, y la porción distal del nervio común peroneal bajo la rodilla sólo aporta algunos ramos musculares en sus dos ramos terminales (nervio peroneal superficial o musculocutáneo y nervio peroneal profundo).

### **B.3. Otras estructuras nerviosas de interés**

Entre las otras estructuras nerviosas que tienen un interés en la anatomía microquirúrgica vamos a destacar las siguientes:



- A) **Nervios craneales:** de ellos presentan un interés microquirúrgico el nervio óptico (II), oculomotor (III), troclear (IV) y abductor (VI), trigémino (V) y facial (VII).
- B) **Sistema vegetativo:** el sistema simpático puede ser objeto de disección microquirúrgica bien a nivel de sus dos grupos de cadena ganglionares (tres cervicales, diez torácicos, seis lumbares, cuatro sacros y un caudal), siendo aisladas desde las porciones cervicales hasta la cola, donde dos pequeños filamentos nerviosos se pierden acompañando a la arteria caudal media. El parasimpático muestra particular interés por las relaciones que el nervio vago establece en la porción inferior del cuello, fundamentalmente con estructuras vasculares.

### C. Morfometría del Nervio Ciático

Dado que el nervio ciático de la rata es el substrato experimental de gran cantidad de estudios experimentales, conviene conocer los datos elementales referentes a la distribución de las fibras de acuerdo a su tipo. Los datos que citamos están obtenidos del trabajo de Schmalbruch (1986), siendo calculados a partir de estudios histológicos convencionales y con microscopía electrónica en animales normales, sometidos a sección de las raíces anteriores de L4-L5-L6 y con simpatectomía lumbar bilateral desde L2 a S2. El nervio ciático contiene 7.800 fibras mielínicas, de las que 4.500 pertenecen al nervio tibial, 1900 al peroneal, 1.050 al sural y 350 a la rama cutánea. Las fibras eferentes mielinizadas, es decir motoras, eran 1.600, mientras que las aferentes sensitivas constituían las 6.200 restantes. Del total de fibras motoras 1.000 circulaban por el nervio tibial y las 600 restantes por el peroneal. El total de fibras amielínicas era de unas 19.000, de las que 6.000 corresponderían a fibras simpáticas y las 13.000 restantes a aferentes sensitivos. Lógicamente existían variaciones individuales, con un margen entre 10-20%.

## III. TECNICAS DE MICROCIRUGIA NERVIOSA

Las técnicas microquirúrgicas nerviosas se desarrollaron a partir de la década de los sesenta. El objetivo de los modelos experimentales es el de reproducir en el animal de laboratorio las condiciones que semejan una determinada patología, extrapolable al ser humano tanto en su patogenia, evolución, como en la terapéutica empleada para su resolución. En el caso del Sistema Nervioso Periférico, dos han sido clásicamente los modelos experimentales planteados, los estudios de regeneración del sistema nervioso periférico y el dolor por lesión del Sistema Nervioso Periférico.

## **A. Técnicas de Reparación Nerviosa**

En el campo experimental, las técnicas microquirúrgicas de reparación de lesiones en el Sistema Nervioso Periférico pretenden básicamente hallar soluciones que posibiliten y favorezcan la regeneración nerviosa. La sutura nerviosa, como ejemplo de proceder, se basa en la capacidad de regeneración que tiene el axón tras una lesión.

Desde un punto de vista teórico, una vez establecida la lesión nerviosa la sutura de la misma puede realizarse en tres momentos evolutivos diferentes:

- Primaria: antes de las 48 horas de establecida la lesión.
- Secundaria (o diferida): antes de las 4 semanas.
- Secundaria tardía: por encima de las 4 semanas.

La técnica empleada variará según el tipo de lesión y las posibilidades de acceder a las técnicas microquirúrgicas. La anestesia y colocación del animal no difieren de lo expuesto en el capítulo de generalidades. El material necesario es mínimo: material de disección microquirúrgico básico (pinzas relojero n.5, microtijeras), lámina de material plástico o caucho (guante quirúrgico) que nos permita aislar o individualizar el plano nervioso, microtorundas u otro material secante para microcirugía y sutura de Nylon de 8-0 a 10-0 (Ethilon, Codman). La posibilidad de trabajar bajo condiciones de isquemia de un miembro, técnica tan empleada en clínica, no es factible en la rata. Finalmente, si no interfiere en la técnica a emplear, se recomienda bañar el campo operatorio con una solución de anestesia local, lo que reduce las aferencias nociceptivas hacia el Sistema Nervioso Central del animal.

Para el estudio del Sistema Nervioso Periférico el nervio ciático de la rata albina es un substrato idóneo, tanto por su accesibilidad quirúrgica como por la posibilidad de contar con ramos adyacentes que facilitan las técnicas de suturas interfasciculares con injerto interpuesto. Se accede al nervio, previo rasurado del muslo del animal, por cara posteroexterna del muslo con una incisión recta de unos 4 cm de longitud siguiendo el eje del mismo. Después se entra por el pliege muscular entre músculo bíceps femoral y músculo abductor crural. De esta forma abordamos al nervio ciático cuando entra al muslo y lo constituyen los nervios tibial, común peroneal y sural.

### **1. Sección Nerviosa y Reparación**

La sección del nervio se hace con unas microtijeras, con lo que se obtiene un corte limpio. La reparación debe hacerse pronto porque el contenido del nervio tiende a extruirse por el cabo distal, mas allá del borde final del epineuro. Cuando la reparación es tardía nos vamos a encontrar con un neuroma terminal, que es necesario extirpar. Posteriormente se hace un refrescamiento de los extremos del nervio, con la finalidad, mediante secciones transversales cada 0.5 a 1.0 mm, de descubrir la arquitectura fascicular normal. En estas



lesiones es conveniente distinguir cuando la distancia entre los extremos sólo es apreciable bajo el microscopio o es pequeña (gap menor a dos veces el diámetro del nervio) de cuando es mayor, ya que el tipo de sutura empleada depende de ello.

La **sutura epineural** supone afrontar directamente los cabos nerviosos, con dos puntos de sutura (Nylon 10/0) a 180º uno de otro. Posteriormente y valiendonos de ellos se puede completar la sutura de la cara anterior y luego de la posterior mediante el número de puntos necesarios, de tal modo que entre ellos no queden eventraciones de fascículos. En ocasiones hay que refrescar los extremos para evitar acabalgamientos defectuosos. En el ciático de la rata son suficientes de 2 a 4 puntos. Para dar cada punto se toma el nervio por el epineuro con la pinza, y se pasa la aguja tratando de perforar solo el mismo. El nudo no precisa nada de presión, ya que solo se pretende que los cabos queden afrontados.

La **sutura perineural o fascicular** obliga a la endoneurolisis previa y refrescamiento de los bordes optativo. En ella, cada fascículo se intenta afrontar a otro y se suturan, siguiendo para cada uno de ellos, las mismas consideraciones técnicas que en el caso de la sutura epidural. Obliga a mostrar al menos 3-5 mm de cada extremo de los fascículos. En el caso del ciático de la rata se obtiene un falso patrón fascicular disecando los nervios que lo constituyen, es decir, el tibial, peroneal y sural.

En ocasiones, y cuando la distancia entre los extremos es grande (gap mayor a dos veces el diámetro del nervio) es obligado emplear **injertos fasciculares**, evitando la tensión en las líneas de sutura que nos las harían fracasar. El injerto nervioso empleado suele obtenerse de un nervio sensitivo, por ejemplo el nervio safeno, contralateral o de un animal dador. De este modo, la sutura, sea epidural o fascicular puede ser termino-terminal o con injerto nervioso interpuesto.

## 2. Neurolisis

Para lesiones nerviosas sin interrupción anatómica la técnica más empleada es la neurolisis o liberación y extirpación del tejido conjuntivo cicatrizal que envuelve al segmento lesionado es la de elección, intentando identificar y aislar la anatomía nerviosa. Si desarrollamos este proceder tal cual, estaremos realizando una exoneurolisis, pero si además extirpamos el tejido fibroso interfascicular, hemos llevado a cabo una endoneurolisis. El proceder se inicia a 4-5 mm de un extremo sano de la lesión, y bajo visualización microscópica se disecciona longitudinalmente el epineuro. Desde ambos extremos se avanza hacia el tramo lesionado hasta completar la extirpación cicatrizal. Si continuamos con la endoneurolisis, tendremos además que liberar los fascículos nerviosos uno a uno o en grupo, intentando conservar su morfología y distribución. Las técnicas de estimulación-registro eléctricas intraoperatorias nos permiten identificar en el acto quirúrgico los fascículos indemnes. Anatómicamente, encontraremos fascículos normales, otros con neuromas en continuidad y fascículos interrumpidos. Es difícil, sin embargo,



desarrollar este tipo de técnicas en la rata. El nervio ciático es demasiado tenue para trabajar a nivel fascicular y para producir modelos en este sentido. Mas interés tiene ahora el plexo braquial, al que se accede a través de una incisión axilar extendida distalmente por la extremidad. Los diferentes nervios del plexo pueden ser atrapados por una cicatriz fibrosa y ser sometidos posteriormente a la neurolisis.

## **B. Modelos para Estudio de la Regeneración Nerviosa**

Usando las técnicas de estudio de regeneración nerviosa se ha comenzado recientemente a indagar sobre el papel que desempeñarían los factores de crecimiento, la exactitud del proceso regenerativo para que los axones alcancen sus puntos diana y los factores que favorecerían estos hechos.

Sin embargo, desde un punto estrictamente técnico, lo que importa es poder reducir la barrera que supone para la regeneración el desarrollo de una cicatriz conectiva como consecuencia de la propia sutura nerviosa. Para ello se han interpuesto entre los cabos nerviosos diferentes estructuras:

- **cámaras de silicona:** tubos de diámetro adecuado, donde se insertan los cabos nerviosos en cada extremo, sujetándolos con un punto de 10/0. La regeneración ocurre dentro del tubo y es efectiva incluso con gaps de 10 mm. La interposición de un fragmento de nervio periférico permite una regeneración efectiva con separaciones aún mayores entre los cabos. A la cámara se le puede conectar un tubo en T, de forma que se puedan liberar en el interior de dicho espacio sustancias cuyo efecto sobre la regeneración se desee conocer.
- **vaina pseudosinovial:** es una variante de la técnica anterior y consiste en implantar en el tejido celular subcutáneo un tubo de silicona, alrededor del que se forma una vaina conectiva reactiva. Unas semanas después se extrae dicha vaina y se utiliza para reparar el nervio.
- **vainas de arteria o vena:** suponen usar un vaso de tamaño adecuado para envolver el nervio. La técnica consiste en abrir el vaso y rodear los cabos nerviosos cerrando posteriormente el vaso sobre el nervio con varios puntos de 10/0.
- **tubos de materiales sintéticos porosos.**

Alternativamente, otras técnicas consisten en estudiar los efectos de determinados tratamientos farmacológicos o físicos sobre la regeneración obtenida con alguno de los métodos descritos y convenientemente estandarizados.

## **C. Modelos para Estudio del Dolor por Lesión del Sistema Nervioso Periférico**

Los modelos experimentales de dolor por lesión del Sistema Nervioso Periférico se basan especialmente en el desarrollo de un neuroma terminal. Para ello se han descrito

la sección del nervio ciático en el muslo y del plexo braquial (Figuras 5-2 y 5-3). Dado que la lesión nerviosa tiene también un componente de deafferentación, algunos autores asocian la sección del nervio femoral a la del ciático, con la idea de producir una mayor pérdida de sensibilidad en la pata. La sección de los nervios en la rata debe asociarse a la resección de unos 5 mm del mismo, para evitar que la regeneración espontánea del cabo proximal reinerve el cabo distal. En este sentido, también algunos autores recomiendan la ligadura del cabo proximal con uno o varios nudos de seda de 5/0. Frente a estos modelos de neuroma terminal se han desarrollado una serie de tratamientos microquirúrgicos con la finalidad de su prevención. Los dos que nuestro grupo ha estudiado profundamente son la ligadura fascicular y la anastomosis centro-central. La primera técnica consiste en cerrar el perineuro del cabo proximal mediante una ligadura y realizar además una coagulación suave del perineuro para desencadenar una fibrosis, lo que hemos demostrado que no impide la salida de los brotes axonales (Figura 5-4). Frente a ello, la anastomosis centro-central, que consiste en anastomosar pares de cabos terminales entre sí interponiendo un injerto de calibre adecuado, es capaz de prevenir el desarrollo del neuroma terminal (Figura 5-5).

Recientemente Bennet y Xie (1988) han descrito un modelo de mononeuropatía, que se consigue mediante la colocación de cuatro ligaduras poco apretadas alrededor del ciático, separadas aproximadamente 1 mm. Para ello se aborda el nervio y se procede a pasar las ligaduras a su alrededor, anudándolas lo suficiente para que bajo gran magnificación no se comprometa la circulación epineural (Figura 5-6). Otro modelo de compresión nerviosa fue descrito por nuestro grupo, realizando un 'loop' vascular alrededor del plexo braquial de la rata (Figura 5-7).

#### **IV. VALORACION DE LAS TECNICAS**

Vamos a considerar las consecuencias clínicas de la lesión de los nervios periféricos y los métodos mas importantes que permiten estudiar la regeneración nerviosa desde un punto de vista morfológico y funcional.

##### **A. Valoración de la Lesión Neurológica**

###### **A.1. Formas Lesionales**

Desde un punto de vista clínico es conveniente distinguir tres grandes tipos lesionales, que se construyen combinando aspectos anatomopatológicos, funcionales y de pronóstico. La neuroapraxia es la interrupción de la conducción nerviosa con conservación morfológica de los componentes de la fibra. En ella la única lesión

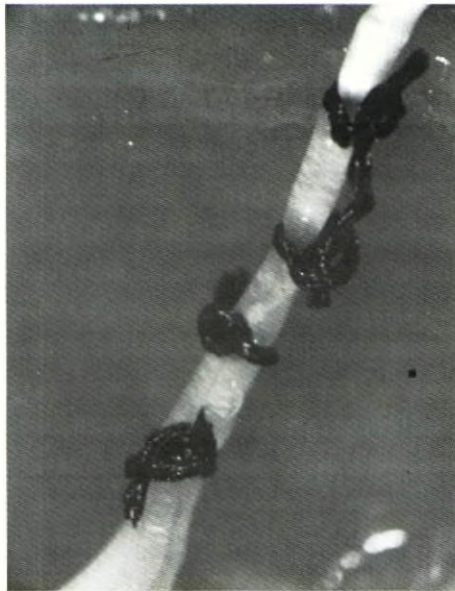




*Figura 5-4.- Doble ligadura fascicular y coagulación de las ramas terminales del nervio ciático.*



*Figura 5-5.- Anastomosis centrocentral entre las ramas terminales del nervio ciático, tras su sección. Los nervios cutáneo, sural y peroneano se han suturado sobre el tibial, interponiendo un injerto.*



*Figura 5-6.- Modelo de compresión crónica del ciático. Se han realizado cuatro ligaduras, sin apretar, separadas aproximadamente 1 mm*



*Figura 5-7.- Modelo de compresión crónica del plexo braquial mediante la realización de un anillo vascular alrededor del mismo, con un injerto de carótida suturado latero-lateralmente a la arteria axilar.*



establecida es la mielínica y de forma microscópica. La axonotmesis supone la interrupción de la conducción nerviosa por rotura del axón y su vaina de mielina, pero con preservación de los tubos endoneurales. Es la forma lesional producida típicamente por compresión o tracción, pero sin establecerse una solución de continuidad en el nervio. Finalmente, la neurotmesis consiste en la pérdida de conducción nerviosa por destrucción de todos los componentes del nervio, aunque en ocasiones el epineuro está íntegro. En este caso, existe habitualmente una solución de continuidad en el nervio o este ha sido sometido a una tracción intensa.

Existen otras clasificaciones más específicas, como la propuesta por Sunderland en cinco grados, u otro tipo de lesión que escapa de las categorías antes señaladas, como acontece en las lesiones irritativas por atrapamiento o la patología de regeneración (neuroma) y en las que otras consideraciones fisiopatológicas han de ser tenidas en cuenta.

## A.2. Hallazgos Clínicos

La sección de un nervio periférico cursa con anestesia de la zona dependiente del mismo y parálisis de la musculatura, que pronto se atrofia. La sensibilidad puede explorarse en el animal mediante un objeto punzante. La parálisis se detecta observando actitudes anormales de las extremidades o en el uso de las mismas al andar o manipular. Es, sin embargo, difícil hacer una valoración fina de la recuperación funcional de la sensibilidad o de la potencia muscular. En el caso del ciático se ha descrito un modelo que se basa en el estudio de las huellas plantares dejadas por el animal cuando se mueve libremente, calculando una serie de parámetros que permiten estudios estadísticos (Medinaceli et al,1982).

Una respuesta del animal a la deaferentación es el autocanibalismo de la zona deaferentada, donde se supone queda referido el dolor o las sensaciones disestésicas sentidas por el animal. Este comportamiento se conoce con el nombre de 'autotomía'. Dado que la intensidad de la autotomía se correlaciona con la intensidad de las sensaciones anómalas sentidas por la rata, se cuantifica la autotomía a través de una escala descrita por Wall et al (1979):

- 1 punto por la autotomía de una o más uñas
- 1 punto por la autotomía de cada media falange
- 1 punto por la autotomía del carpo/tarso
- 1 punto por la autotomía del metacarpo/metatarso,

de forma que la autotomía máxima en la extremidad superior es de 11 puntos (tiene cuatro dedos) mientras que la de la extremidad inferior es de 13 puntos (tiene cinco dedos), aunque debido a la distribución sensitiva del ciático, la sección de este nervio sólo provoca la autotomía de tres dedos, con una puntuación máxima de 9 puntos. En la valoración de la autotomía se tienen en cuenta los siguientes parámetros a la hora de hacer estudios

estadísticos: día de comienzo de la conducta de autotomía; evolución semanal de la puntuación de autotomía; porcentaje semanal y final de animales que han comenzado la autotomía; porcentaje de animales que superan una determinada puntuación de autotomía ( 4 ó 6 puntos); y, finalmente, día en que se alcanza la puntuación de autotomía máxima. Algunos grupos suelen subdividir los animales de cada experiencia en dos lotes separados, según exhiban un comienzo precoz o tardío de la autotomía. Como es lógico, las lesiones de autotomía no regresan, salvo si se exceptúan las lesiones aisladas de las uñas.

La comprensión del ciático se sigue también de cambios en la temperatura cutánea y una respuesta exagerada a los estímulos nociceptivos mecánicos o térmicos (algodinía).

## **B. Técnicas Histológicas**

El conocimiento de la estructura nerviosa puede hacerse desde tres puntos de vista. El primero es morfológico y su validez radica en mostrarnos desde la estructura nerviosa axonal íntegra, mediante técnicas de morfometría, a la degeneración secundaria de las estructuras distales a una lesión axonal, mediante métodos como el de la impregnación con plata de Nauta y Gygax. El segundo proceder es fisiológico y nos permite por ejemplo reconocer cuáles son las áreas posibles de proyección de una fibra nerviosa y su funcionalidad, recurriendo a los potenciales evocados. En tercer lugar, existen actualmente técnicas morfológicas que nos posibilitan el conocimiento de tractos de fibras nerviosas o el desarrollo de las mismas, gracias por ejemplo a métodos como el de Weigert, ofreciéndonos el aspecto dinámico de la histología.

El amplio número de técnicas que se han ido desarrollando y su especificidad, nos obliga a reflejar sólo las más interesantes de manera agrupada. Es de tener en cuenta, que todas aquellas que toman a la mielina como punto de acción nos objetivarán sólo a los grupos de fibras mielínicas aferentes y eferentes, en perjuicio de las fibras autonómicas preganglionares y las fibras amielínicas aferentes sensitivas y autonómicas postganglionares.

### **B.1. Técnicas de Fijación**

Cuando nos planteamos proceder al estudio histológico de una pieza anatómica el primer paso en el procesado es la fijación. Esta puede llevarse a cabo 'in vivo' perfundiendo el órgano instantes antes del sacrificio del animal, y que se continúa luego 'in vitro' mediante el proceder determinado por la técnica histológica a emplear. La perfusión de órganos sólo precisa de un sistema o aparato de perfusión (manual, como un esfigmomanómetro, o eléctrico) y un medio a perfundir, habitualmente constituido por dos soluciones, la primera de lavado suele ser suero fisiológico mientras que la segunda



solución es la fijadora. Si bien las técnicas de fijación “in vivo” son usuales en el procesado del Sistema Nervioso Central, su uso no es tan frecuente para el periférico. Aún así, cuando interese realizarla, el punto de perfusión es el ventrículo izquierdo o la arteria aorta torácica. Las técnicas de fijación ‘in vitro’ son las usuales, mostrándose para el nervio periférico particularmente idóneo el glutaraldehído al 5 %.

## B.2. Técnicas Histológicas

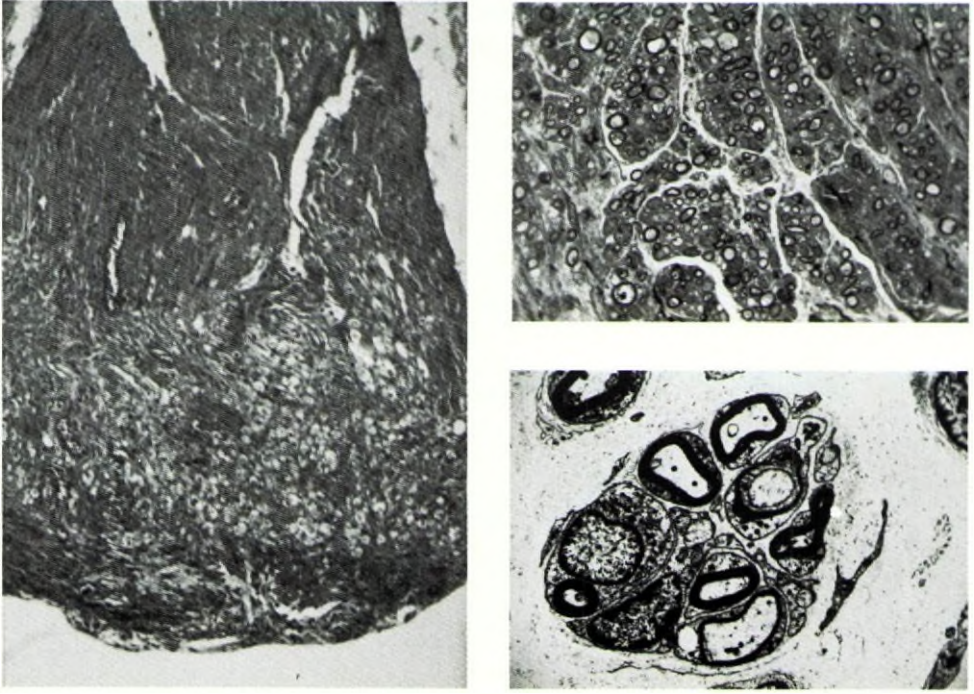
No vamos a entrar en detalle de toda y cada una de las técnicas histológicas interesantes en el Sistema Nervioso Periférico, pero sí es conveniente enumerar las más usuales de manera agrupada. Ya Ramón y Cajal en su “Descripción de las técnicas micrográficas del Sistema Nervioso” enumera muy distintos procedimientos. Con fines prácticos los agruparemos en :

**Técnicas sobre nervio íntegro o normal.** Incluyen desde el examen en fresco del tejido nervioso a las técnicas con fines más específicos, como la de nitración para evidenciar los nódulos de Ranvier, el de Nageotte para mostrar la célula de Schwann mediante hematoxilina, o las de plata amoniacal de Cajal y con azul de metileno de Doinikov con el mismo fin. Para demostrar la mielina se han desarrollado técnicas con ácido ósmico, así como para el conectivo nervioso son válidas las técnicas con hematoxilina y la tricrómica de Van Geison. Para el estudio del cilindro-eje y fibras nerviosas, hoy día podemos emplear las tinciones con azul de toluidina. En estos casos, la inclusión es conveniente realizarla en Epon-resina, elaborar una pirámide y proceder a practicar cortes semifinos (2-3 micras) para microscopía óptica, pudiendo tomar también cortes ultrafinos (menores a 1  $\mu$ , entre 400-800 Amstrong) para microscopía electrónica (Figura 5-8).

**Técnicas para el estudio de la degeneración y regeneración.** En estas ocasiones, el método al nitrato de plata de Cajal continúa vigente, a pesar del avance que han supuesto las técnicas antes comentadas con azul de toluidina en Epon-resina. Es interesante señalar para este grupo de estudio, que la degeneración axonal distal puede observarse con técnicas de microscopía electrónica ya a las dos horas y media de establecida la lesión. Esta degeneración no se completa hasta transcurridos 21-34 días. La regeneración nerviosa subsiguiente acontece ‘aprovechando’ las cubiertas endoneurales de fibras que ya han degenerado. El grado de crecimiento de tales fibras se estimula en 0.15-0.25 mm/día a nivel del muñón lesional o ‘gap’ y de 2.0-3.5 mm/día en los tubos endoneurales íntegros. Si no existe cabo distal a la lesión, la regeneración de los brotes axonales será anárquica y se constituirá un neuroma. No obstante, diversos elementos pueden funcionar como soporte a los brotes axonales en crecimiento, y la velocidad de desarrollo de los mismos variará en función del medio material y las condiciones que encuentren.

**Morfometría.** Las técnicas con azul de toluidina sobre material incluido en Epon-resina permiten analizar morfométricamente el nervio. El grosor de una fibra normal





**Figura 5-8.-** Estudio histológico del neuroma terminal desarrollado como consecuencia de la sección del nervio ciático. Hematoxilina & eosina (izquierda); semifino teñido con azul de toluidina (arriba); ultrafino teñido con tetróxido de ósmio y estudiado con microscopía electrónica (abajo).

oscila entre 1-16 micras y para evitar artefactos en su procesamiento, es esencial utilizar tetróxido de osmio para su fijación. La morfometría permite la cuantificación y valoración de los distintos tipos de fibras, permitiéndonos por ejemplo, elaborar histogramas según el tamaño de la fibra o el grosor de su mielina. El conteo puede hacerse de todas las fibras del nervio o de campos significativos. También puede expresarse el resultado en porcentaje de superficie ocupada por fibras o por tejido de relleno. En todo caso, para contar fibras amielínicas se precisa la microscopía electrónica.

**Técnicas de transporte axonal y marcaje de vías nerviosas.** El desarrollo de nuevas técnicas neuronográficas permite obtener visión más dinámica de la morfología nerviosa. Las técnicas de transporte axonal ocasionan un sustancial avance en el conocimiento de vías nerviosas, análisis de microcircuitos neuronales y sus proyecciones. Estas técnicas combinan la histoquímica de hibridación 'in vitro', la cuantificación autorradiográfica de receptores, el empleo de marcadores bioquímicos y las técnicas neurofisiológicas. Todo ello, junto al empleo de sistema de análisis de imagen asistidos por ordenador y a los procedimientos inmunológicos microscópicos, están abriendo permanentemente nuevas vías en nuestro conocimiento neuroanatómico.

### B.3. Otras técnicas

Escapa de este capítulo su descripción precisa, pero basta enumerar como las técnicas más utilizadas:

- a) Marcadores retrógrados fluorescentes fundamentalmente isocianato de tetrametil-rodamina (TRITC) y fluorescein isocianato (FITC), en combinación con métodos inmunohistoquímicos.
- b) Métodos de transporte axonal anterógrado con la leucoaglutinina de lecitina de la *Phaseolus vulgaris* (PHA-L) y la peroxidasa de rábano (HRP), de particular interés en el marcaje de las proyecciones axonales neuronales. Ambas técnicas pueden combinarse con el fin de correlacionar los hallazgos en microscopía óptica y electrónica.
- c) Otras técnicas en desarrollo actual son los marcajes autorradiográficos y los métodos inmunocitoquímicos para la identificación de moléculas neuronales y técnica de hibridación combinada.

### C. Estudios Neurofisiológicos

Los métodos electrofisiológicos clásicos de estudio en el Sistema Nervioso Periférico se han centrado en las técnicas de estimulación-registro. Colocando electrodos de registro a nivel de las estructuras nerviosas que nos interesan valorar y el cátodo de estimulación en el punto nervioso o muscular deseado, podremos conocer la velocidad de conducción, latencia del impulso y otros datos que traducen la funcionalidad del nervio. Si desarrollamos múltiples impulsos en el cátodo de estimulación, el registro obtenido una vez integrado nos permitirá conocer una media que se aproxima más al valor real. Este sistema es el empleado por ejemplo en los potenciales de acción somatosensoriales, que permiten valorar una vía nerviosa motora desde la unión neuro-muscular hasta su integración cortical. La frecuencia de impulsos más usualmente empleada es de 2.048 pulsos/s. La duración de una punta (spike) individual a cada estímulo, varía inversamente con la velocidad de conducción de la fibra, de manera que a 37° C la duración de un 'spike' es de 0.35 ms para una fibra que conduce a 70 m/s y es de 0.60 ms para la que lo hace a 10 m/s.

Hoy día, gracias al avance técnico en los procedimientos electroneurales, podemos canular un soma neuronal de manera individualizada, medir el potencial de acción transmembranario y cuantificar en su axón la velocidad del impulso nervioso, así como marcar inmunohistoquímicamente la fibra nerviosa en cuestión hasta su unión neuro-muscular.





## REFERENCIAS

- Bennet GJ, Xie YK. A peripheral mononeuropathy in rat produces disorders of pain sensation like those seen in man. *Pain* 33: 87-107, 1988.
- Boyd IA, Davey MR. *Composition of peripheral nerves*. London. Livingstone, 1968.
- García-Vázquez F, González-Darder JM, Barberá-Alacreu J, Vilches-Troya J. La anastomosis centro-central con fibrina como alternativa en el tratamiento del neuroma doloroso. Estudio experimental. *Cir Esp* 44: 732-738, 1988.
- Gil Salú JL. *Valoración de la Regeneración Nerviosa en la Anastomosis Centro-Central. Estudio experimental*. Tesis de Licenciatura. Universidad de Cádiz, 1986.
- Gil-Salú JL, González-Darder JM. Study of nerve regeneration in centrocentral anastomosis. *Acta Neurochirurg (Wien)* 105: 39-43, 1990.
- González-Darder JM, Barberá J, Gil-Salú JL, García-Vázquez F. Nerve regeneration in the centrocentral anastomosis. En Samii M (ed): *Peripheral Nerve Lesions*. Berlin-Heidelberg. Springer-Verlag, 1990, pp 75-80.
- González-Darder JM, Barberá J, Abellán MJ, Mora A. Centrocentral anastomosis in the prevention and treatment of painful terminal neuroma. An experimental study in the rat. *J Neurosurg* 63: 754-758, 1985.
- González-Darder JM, Barberá J, Abellán MJ. Effects of prior anesthesia on autotomy following sciatic transection in rats. *Pain* 24: 87-91, 1986
- González-Darder JM, Barberá J, Alamo J, García-Vázquez F. Fascicular ligation in the prevention and treatment of painful terminal neuroma. An experimental study in the rat. *Neurosurgery* 21: 215-217, 1987.
- González-Darder JM, Barberá J, Durán J, García-Vázquez F. Medida del dolor en modelos animales de dolor por deaferentación. *Arch de Neurobiol* 51: 3-7, 1988
- González-Darder, Gómez-Cárdenas E, Ruz-Franzi I, Bernal-Cerezo J, Gil-Salú JL, Segura-Pastor D, de la Orden E. Modelos animales de dolor crónico por deaferentación. *Res Surg, supl* 5: 57-64, 1990.
- Greene EC. *Anatomy of the rat*. New York. Hafner Publishing Co. 1983.
- Heimer L, Záborsky L (eds). *Neuroanatomical tract-tracing methods*. New York. Plenum Press, 1989.
- Lundborg G, Dahlin LB, Danielsen N, Gelberman RH, Longo FM, Powell HC, Varon S. Nerve regeneration in silicone chambers: influence of gap length and of distal stump components. *Exp Neurol* 76: 361-375, 1982
- Medinaceli L, Freed W, Wyatt RJ. An index of the functional condition of rat sciatic nerve based on measurements made from walking tracks. *Exp Neurol* 77: 634-643, 1982.
- Ramón y Cajal S. *Histologie du Système Nerveux de l'homme et des vertébrés*. Madrid. Consejo Superior de Investigaciones Científicas e Instituto Ramón y Cajal, 1952.
- Ramón y Cajal S. *Elementos de técnica micrográfica del Sistema Nervioso*. Barcelona. Salvat, 2ª ed. 1972.
- Rowett HGS. *Guías de disección-III. La rata*. Barcelona. Ediciones Urania, 1976.

- Senra Renom JM, Cañadell J. *Microcirugía en quirófano experimental*. Pamplona. Universidad de Navarra, 1979.
- Schmalbruch H. Fiber composition of the rat sciatic nerve. *Anat Rec* 215: 71-81, 1986.
- Wall PD, Devor M, Inval R, Scadding JW, Schonfeld D, Seltzer Z, Tomkiewicz MM. Autotomy following peripheral nerve lesions: experimental anesthesia dolorosa. *Pain* 7: 103-113, 1979.
- Waynforth HB. *Experimental and surgical technique in the rat*. London. Academic Press, 1980.
- Zeman W, Innes M. *Craigie's Neuroanatomy of the rat*. New York-London. Academic Press. 1963.

# 6

## TECNICAS SOBRE EL RAQUIS, MEDULA Y RAICES

---

- I. Introducción
  - II. Anatomía Microquirúrgica del Raquis de la Rata
    - A. Estructura de la Columna Vertebral
    - B. Estructura de la Médula Espinal
    - C. Estructura de la Raíz Dorsal
    - D. Distribución Radicular
  - III. Abordajes Microquirúrgicos al Raquis
    - A. Abordaje Occipito-Atloideo
    - B. Abordaje al Raquis Cervical, Torácico y Lumbar
  - IV. Valoración de las Técnicas
    - A. Valoración de la Lesión Neurológica
    - B. Control de la Funcionalidad del Catéter Espinal
-





## **I. INTRODUCCION**

El raquis de la rata es un punto de abordaje para la realización de técnicas propiamente neuroquirúrgicas y de otras en donde la médula o raíces son el substrato de manipulaciones para experiencias farmacológicas. El abordaje a la médula y raíces implica la realización de una laminectomía, que es la técnica básica para cualquier otra a realizar en el interior del canal raquídeo.

## **II. ANATOMIA MICROQUIRURGICA DEL RAQUIS DE LA RATA**

Vamos a considerar separadamente la estructura ósea y el contenido, especialmente médula y raíces.

### **A. Estructura de la Columna Vertebral**

La columna vertebral de la rata constituye una parte importante de su esqueleto axial, estando formada por una serie de vértebras unidas por las articulaciones intervertebrales, que forman en conjunto un eje firme pero flexible, que protege la médula espinal.

La rata posee un total de entre 57 y 60 vértebras dispuestas en varios grupos. Las vértebras del segmento cervical disponen, como característica diferenciadora, de unos canales para las arterias vertebrales, que pueden estar ausentes en la séptima vértebra. Las dos primeras vértebras, atlas y axis, se encuentran diferenciadas del resto, la primera por no poseer cuerpo y la segunda por poseer la apófisis odontoides y una voluminosa apófisis espinosa. El resto de vértebras cervicales tienen una apófisis espinosa poco desarrollada y las láminas son cuadradas y delgadas, dejando amplio espacio entre ellas, mientras que los cuerpos tienen un diámetro anteroposterior menor que el transversal. Las trece vértebras torácicas están dotadas de largas espinosas inclinadas y poseen los correspondientes pares de costillas. La segunda vértebra dispone de una larga apófisis espinosa, que sirve como referencia en los abordajes a la zona, mientras que las transversales tienen una carilla articular destinada a cada costilla. El cuerpo vertebral es

cuadrado. Las seis vértebras lumbares son las mas grandes, tanto mas grandes cuanto mas distales. El diámetro anteroposterior del cuerpo es mayor que el transverso. Las espinosas son cuadradas y voluminosas, así como los macizos articulares, por lo que queda muy poco espacio correspondiente a la lámina y el espacio interlaminar es además muy estrecho. Mas distalmente tenemos el sacro, que constituye una vértebra única, y las numerosas vértebras caudales, que en número de veintisiete a treinta constituyen la cola del animal.

Entre cada par de cuerpos vertebrales existe un disco intervertebral, muy bien desarrollado en todos los niveles del raquis. A nivel cervical poseen dos rebordes que encajan con dos surcos del platillo contrario, mientras que a nivel caudal tienen seis depresiones, dispuestas radialmente, que se corresponden a otras tantas prominencias. Estos rebordes evitan el deslizamiento de las vértebras en las zonas mas móviles. Las superficies somáticas de los cuerpos dorsales son practicamente planos y el deslizamiento lateral se evita mediante las cabezas costales. Finalmente, en la región lumbar los discos son muy convexos y estan firmemente unidos a las superficies somáticas, que son muy cóncavas.

De entre los elementos del sistema ligamentario destacan el ligamento longitudinal común anterior y el posterior y el supraespinoso, que van desde la región occipito-atloidea hasta el sacro. Los ligamentos amarillos unen las láminas entre sí y los interespinosos están entre las apófisis espinosas.

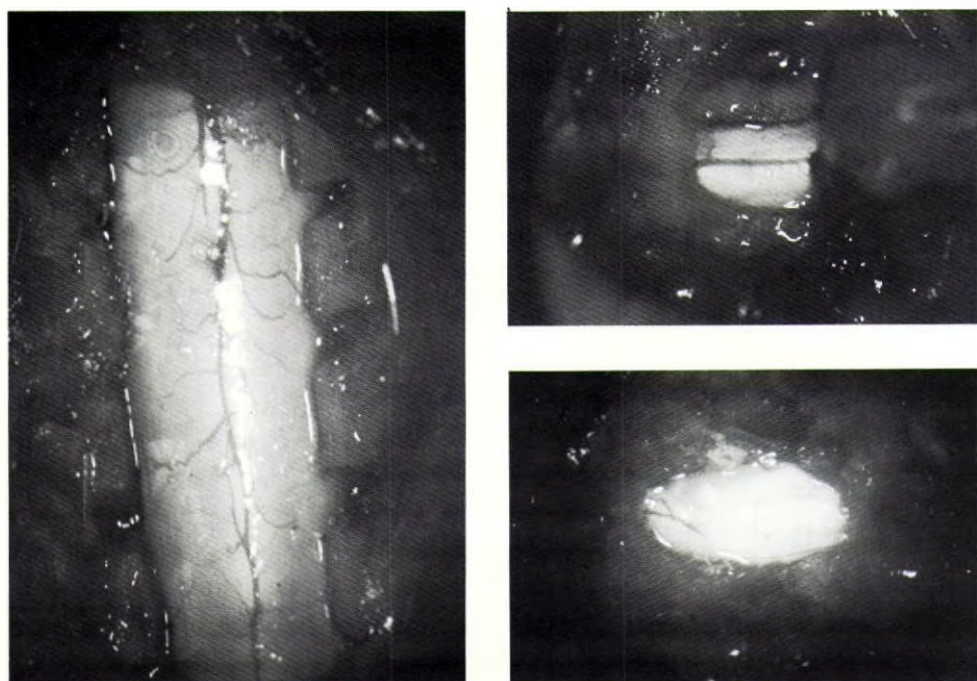
El canal raquídeo se extiende a lo largo de toda la columna, proporcionando protección a la médula espinal y raíces, filum terminale y a los diferentes elementos vasculares. Los nervios salen a través de los agujeros de conjunción existentes entre cada par de vértebras adyacentes.

## **B. Estructura de la Médula Espinal**

La estructura citoarquitectónica de la médula de la rata es semejante a la humana, pudiendo distinguirse la sustancia blanca, con los cordones posteriores, anteriores y laterales, y la sustancia gris, con el asta anterior y posterior. En la sustancia gris se consideran las doce capas de Rexed, de acuerdo a la profundidad de las mismas. Por la parte mas profunda de los cordones posteriores existe un voluminoso tracto corticoespinal descendente (Paxinos y Watson, 1886).

La longitud de la médula de la rata es de unos 12 cm. Aunque su forma es cilíndrica tiene dos engrosamientos, uno a nivel cervical y otro a nivel lumbar. La médula termina en el cuarto segmento lumbar y se sigue de un largo filum terminale, que puede reconocerse hasta en la cola (Figura 6-1). La médula espinal está recubierta por la duramadre, que es muy tenue en toda su longitud. Presenta, en su cara dorsal, una delicada vascularización que penetra a través de las raíces, con un vaso central dorsal bien



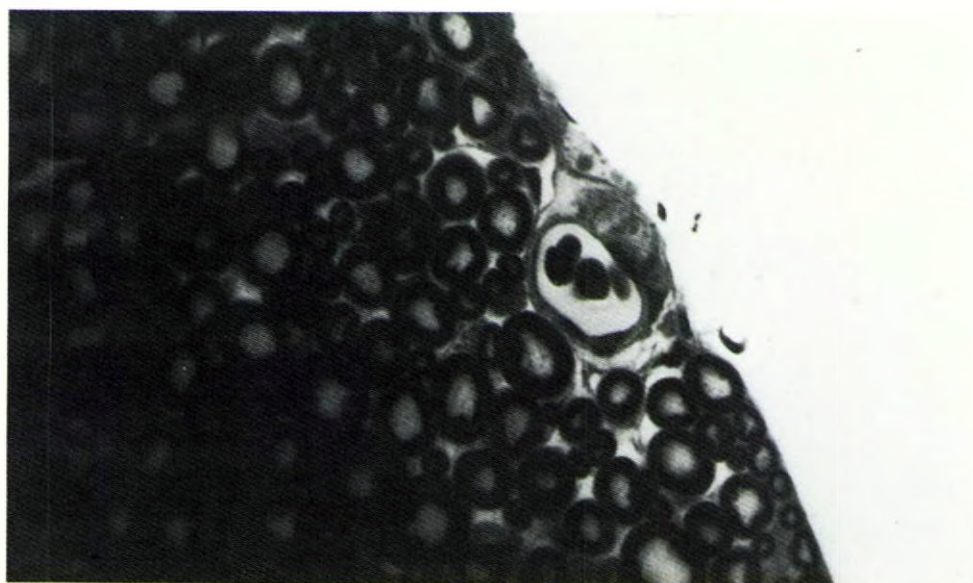


**Figura 6-1.-** Aspecto de la médula cervical (izquierda), dorsal (arriba) y lumbar con la cola de caballo (abajo), vistas por su cara dorsal tras una laminectomía.

prominente. La vascularización es segmentaria a partir de las arterias radicales, con múltiples vías anastomóticas. A nivel cervical destaca la existencia prácticamente constante de una rama unilateral, que entra por la raíz C5 ó C6 y se anastomosa con la espinal posterior. Hay dos vías fundamentales, las arterias espinal anterior y posterior, a partir de las que parte la irrigación intrínseca de la médula. El flujo es mucho mayor en la sustancia gris que en la blanca, debido a las diferentes demandas metabólicas de ambas zonas y su distinta estructura morfológica. Se calcula un flujo de 64 ml/100 g/min en la sustancia gris frente a 20 ml/100g/min en la sustancia blanca. De todas formas, la red anastomótica intramedular es muy amplia, de forma que la ligadura de la aorta torácica o abdominal se siguen de una reducción importante del flujo medular, que se recupera sin embargo horas después. El drenaje venoso se hace centrífugamente.

### C. Estructura de la Raíz Dorsal

En el estudio del dolor es particularmente interesante la raíz posterior o dorsal, ya que por ella entran la mayor parte de las aferencias sensitivas. La raíz es un paquete compacto de fibras nerviosas rodeado de una capa tenue de células perineuriales y con un muy



*Figura 6-2.- Microfotografía de una raíz dorsal lumbar de la rata. Se aprecia cómo está constituida por fibras rodeadas de una tenue capa de tejido perineural (azul de Toluidina, x400).*

escaso endoneuro (Figura 6-2). Suh et al (1984) estudiaron la composición de las fibras en las raíces posteriores L6, S1 y S2 de la rata, demostrando que la superficie de fibras mielínicas proximal al ganglio dorsal era de  $13.72 \mu\text{m}^2$ , mientras que distalmente aumentaba a  $27.82 \mu\text{m}^2$ . Lo mismo sucede con las fibras amielínicas, con una superficie media proximalmente al ganglio de  $0.14 \mu\text{m}^2$  frente a los  $0.55 \mu\text{m}^2$  distalmente, con lo que se demuestra que el tamaño de las fibras mielínicas y amielínicas es sustancialmente mayor cuando se miden distalmente al ganglio. Así, el diámetro medio de los axones mielinizados proximalmente al ganglio es de  $4.18 \mu\text{m}^2$  y distalmente aumenta a  $5.95 \mu\text{m}^2$ , mientras que el de las fibras amielínicas pasa de  $0.14 \mu\text{m}^2$  a  $0.55 \mu\text{m}^2$ .

#### **D. Distribución Radicular**

La rata tiene 8 raíces cervicales, 13 torácicas, 6 lumbares, 4 sacras y 3 caudales, es decir, un total de 34 raíces. Como sucede en la especie humana las más importantes funcionalmente son las raíces cervicales y lumbosacras.

Las raíces cervicales salen del ensanchamiento cervical de la médula espinal. Las raíces dorsales se identifican fácilmente como estructuras de aspecto grisáceo que cruzan transversalmente la médula a espacios regulares. Los ganglios cervicales están dentro del canal, excepto el segundo, que se halla entre el atlas y el axis. Las raíces cervicales 5ª a



8ª así como la primera torácica forman el plexo braquial, suplementado por fibras de la 4ª raíz cervical y 2ª torácica. La inervación sensitiva de la extremidad superior tiene un claro patrón radicular, inervando la raíz C5 la parte craneal del brazo; C6 llega hasta el primer dedo; C7 segundo y tercer dedos; C8 cuarto dedo y borde axilar; y, finalmente, T1 el borde axilar (Figura 6-3).

La raíces lumbares, sacras y caudales forman la cola de caballo, rodeando a la médula cada vez mas adelgazada y al filum terminale. Los ganglios están dentro del canal y se identifican fácilmente como estructuras grisáceas que rodean a la raíz dorsal cerca del agujero de conjunción. Las 6 raíces lumbares y la primera sacra forman a su salida del raquis el plexo lumbosacro, aunque ocasionalmente se añade la 13ª torácica que se une a la primera lumbar. El plexo lumbar está formado por las primera cuatro o cinco raíces lumbares, inmersas en el músculo psoas y por delante de las apófisis transversas, teniendo enseguida íntimas conexiones con la cadena simpática. Las ramas mas importantes son el nervio femoral (n.crurol) formado por las raíces L2,L3 y L4 y el obturador, formado también a partir de las raíces L2,L3 y L4. El plexo sacro está formado en la rata por las raíces cuarta y quinta lumbares así como por parte de la sexta raíz lumbar. La rama mas importante es el nervio ciático.

Desde un punto de vista funcional, Moyer y Kimmel describieron en 1948 los resultados de la estimulación eléctrica de las principales raíces lumbares, con los siguientes resultados en lo que se refiere a la función motora:

Raíz L2: flexión de la cadera

Raíz L3: flexión de la cadera  
extensión de la rodilla  
dorsiflexión del tobillo

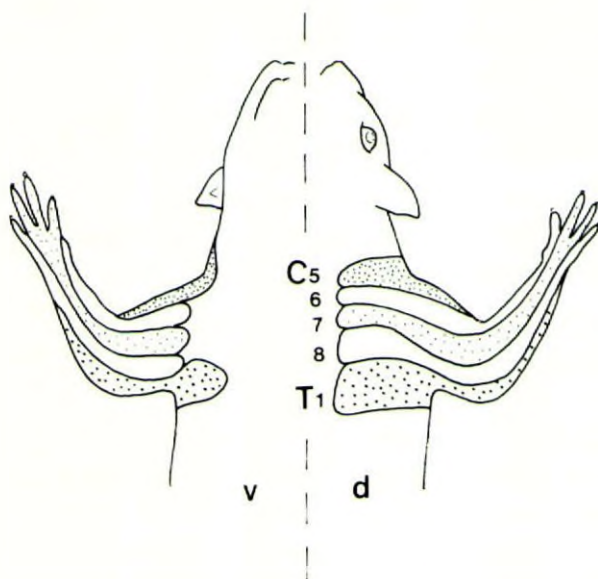
Raíz L4: extensión de la cadera  
flexión de la rodilla  
flexión de los dedos  
abducción del 5º dedo

Raíz L5: extensión de la cadera  
flexión de la rodilla  
flexión plantar del tobillo  
extensión, flexión y separación de los dedos

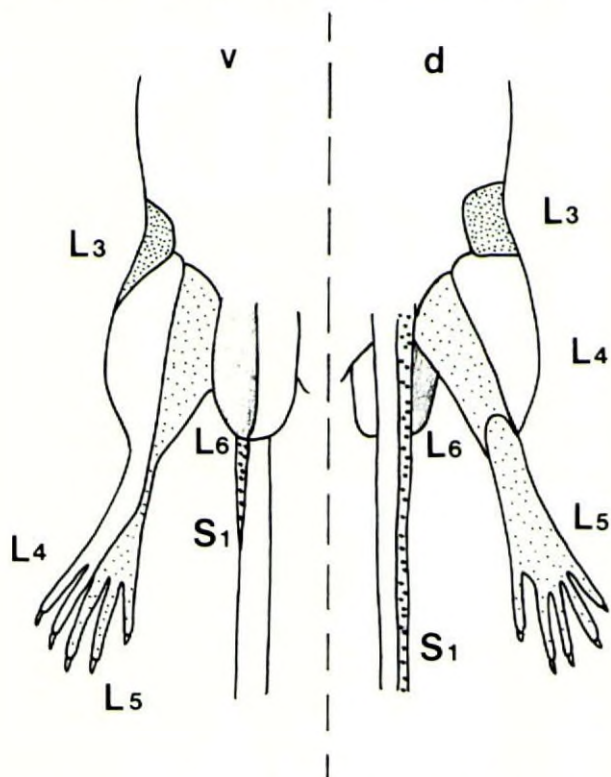
Raíz L6: la cola se inclina hacia el lado estimulado

En cuanto a la distribución sensitiva, la raíz L4 inerva el borde externo de la pata incluyendo el primer dedo y la mitad del segundo; la raíz L5 inerva el resto de la pata; las raíces L6 y S1 inervan la base de la cola y la cola; las raíces L3 y L2 recogen la sensibilidad de las porciones mas proximales de la pata (Figura 6-4).





**Figura 6-3.-** Esquema que representa el patrón radicular de la inervación de la extremidad superior de la rata, vista por su cara ventral (v) y dorsal (d) (Lombard et al, 1979).



**Figura 6-4.-** Esquema que representa el patrón radicular de la inervación de la extremidad inferior de la rata, vista por su cara ventral (v) y dorsal (d) (Lombard et al, 1979).

### **III. ABORDAJES MICROQUIRURGICOS AL RAQUIS**

Aunque pueda parecer lo contrario, la técnica quirúrgica de abordaje a los diferentes segmentos del raquis de la rata es muy diferente, debido sobre todo a las diferencias en la constitución anatómica de cada porción. El material quirúrgico necesario es el básico descrito en el capítulo correspondiente, al que se debe añadir unas almohadillas de tamaño y forma adecuada para apoyar al animal en el abordaje de cada uno de los segmentos del raquis. El instrumento más específico es la microgubia, que en nuestro caso es una pinza cortacutículas de manicura.

#### **A. Abordaje Occipito-Atloideo**

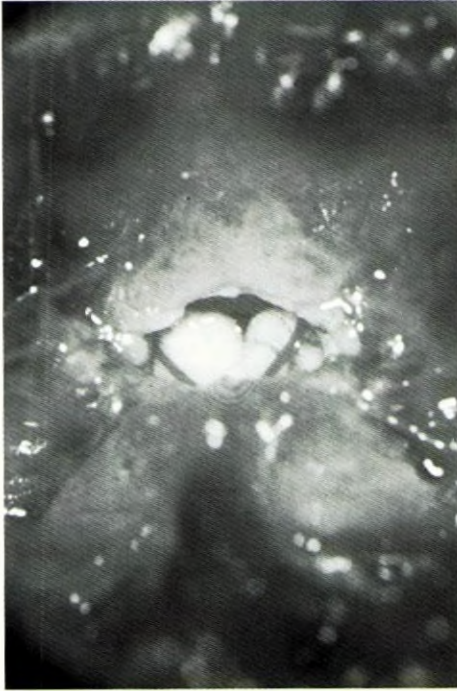
Este abordaje se emplea fundamentalmente para acceder a la cisterna magnocerebelosa y obtener líquido cefalorraquídeo, así como para la colocación de catéteres según la técnica de Yaksh.

Una vez anestesiada la rata se coloca en decúbito prono sobre un apoyo de goma espuma, de forma que quede con la cabeza ligeramente flexionada. En esta posición no es infrecuente que quede excesivamente comprimido el tórax y se produzca un problema ventilatorio grave, con la muerte del animal, por lo que debe cuidarse este hecho evitando la excesiva compresión del cuerpo del animal y vigilando repetidamente los movimientos respiratorios. Se hace entonces una incisión longitudinal en la línea media, desde el cráneo hasta la espinosa prominente. Inicialmente se identifica la línea media, por donde salen unos delicados filetes nerviosos sensitivos que es conveniente bloquear con anestesia local. Se disecciona la musculatura cervical siguiendo escrupulosamente la línea media y se liberan las inserciones en el occipital y en la espinosa del axis, así como en el atlas. Se identifica enseguida la membrana occipito-atloidea, que queda tensada con la flexión forzada de la cabeza. A través de ella puede verse la vallécula, con el cuarto ventrículo y el vermis cerebeloso (Figura 6-5). La incisión o punción de la membrana, y duramadre subyacente, permiten la salida del líquido cefalorraquídeo.

#### **A.1. Técnica de Obtención de Líquido Cefalorraquídeo**

La forma más sencilla de obtener líquido cefalorraquídeo (LCR) es mediante la punción percutánea de la cisterna magna. Para ello se toma como referencia la protuberancia occipital externa y se desliza una aguja conectada a un catéter hasta perforar la membrana occipito-atloidea, momento en el que fluye el LCR. Si se aspira se suele producir un efecto de pared, por lo que lo mejor es dejar que el líquido vaya fluyendo por gravedad o efecto sifón. Una variante de la técnica es realizar un abordaje a cielo abierto al espacio occipito-





*Figura 6-5.- Abordaje occipito-atloideo. Se ha resecado la membrana occipito-atloidea y la duramadre, observándose la vallécula y la vascularización del tejido nervioso.*

atloideo y puncionar dicha membrana bajo el control del microscopio quirúrgico. La recogida directa de muestras de LCR tiene dos problemas, la escasa cantidad de LCR que se consigue (0.1-0.4 ml) y que suele contaminarse con sangre. Para obviar estos hechos se puede obtener LCR usando una técnica de perfusión del espacio subaracnoideo.

La perfusión se hace con solución de Krebs a 37°C y con una bomba eléctrica de infusión (Harvard Syringe Pumps), que se programa con un flujo de 0.1 ml/min. Tras un periodo de 30-45 minutos de infusión se ha lavado lo suficiente el LCR como para considerar estabilizada su composición y sólo entonces se toman las muestras basales y, posteriormente, las problema. Con el flujo programado se obtiene una cantidad de 0.5 ml en 5 minutos, suficiente para una determinación con radioinmunoensayo. Es conveniente, sin embargo, tomar varias muestras seguidas durante cada fase de la experiencia (unas 5, es decir 25 minutos), para obtener resultados mas valorables. El LCR de salida se recoge en frascos de plástico que son introducidos en hielo e inmediatamente se almacenan a - 20°C para su posterior estudio.

Para la obtención de LCR a nivel cervical alto se aborda el espacio occipito-atloideo, se incide la duramadre y la aracnoides hasta descubrir el obex, colocando un primer catéter para infusión en sentido caudal y luego el catéter de recogida, paralelo al anterior y con su extremo inferior localizado en el punto deseado, de forma que la perfusión recorra el territorio deseado. Así si el catéter de infusión se lleva caudalmente unos 15 mm



(nivel C4-C5) y el de recogida se coloca en el borde inferior del bulbo, la zona perfundida correspondería al territorio trigeminal y cervical alto (C1 a C3). La perfusión de la zona lumbar se hace de forma parecida, realizando ahora una laminectomía lumbar alta y colocando los catéteres de forma semejante, dirigidos en sentido caudal y siendo el más lejano el perfusor y el más proximal el de recogida.

La caterización espinal según la técnica de Yaksh se hace desde la membrana occipito-atloidea, bien sea epi o intradural. Para ello se desliza el catéter desde esta zona, en sentido caudal, hasta el segmento deseado. La larga distancia que el catéter recorre en el interior del canal sirve de sujeción del mismo, aunque es recomendable su firme sujeción con cemento dental y un tornillo en el cráneo.

## **B. Abordaje al Raquis Cervical, Torácico y Lumbar**

El abordaje al raquis se realiza fundamentalmente para acceder al espacio intrarraquídeo con la finalidad de colocar catéteres para administración de drogas o de manipular los elementos nerviosos contenidos en el mismo, es decir, médula espinal y raíces.

### **B.1. Laminectomía**

El acceso al raquis cervical supone la misma colocación, precauciones e incisión cutánea que las descritas para el abordaje occipito-atloideo. Es muy importante seguir la línea media, ya que de lo contrario se producen hemorragias y, lo que es más importante, se pierde fácilmente el camino hacia el raquis. Se deben cortar con tijeras las incisiones musculares craneales, de la espinosa prominente y de los músculos paravertebrales más profundos en las espinosas cervicales. Estas son muy cortas, prácticamente inexistentes, de forma que liberadas estas inserciones, colocado adecuadamente el separador y realizada una cuidadosa desperiostización, se pueden ver todas las láminas como bandas óseas que cruzan el canal raquídeo, dejando entre ellas un espacio interlaminar ocupado por un ligamento amarillo tan tenue, que permite ver a su través la médula y sus vasos. Se extirpan tantas láminas como se deseen con una microgubia, pero teniendo cuidado en sus porciones más laterales ya que se pueden producir profusas hemorragias venosas epidurales. La duramadre se abre rasgándola con una aguja y, posteriormente, separándola con las pinzas. Ocasionalmente, el amplio espacio interlaminar es suficiente para introducir en el espacio epidural electrodos o catéteres (Figura 6-6).

El acceso al raquis dorsal es relativamente fácil, ya que existe muy poca musculatura paravertebral y las vértebras están muy superficiales, aunque el canal es relativamente más estrecho al estar ocupado en la mayor parte de su volumen por la médula. Por el contrario, en el raquis lumbar existe una potente musculatura paravertebral y la estructura

del arco neural de las vértebras es más potente, de forma que el sangrado es más profuso. En ambas topografías es necesario mantener la línea media hasta alcanzar las espinosas, para proceder luego a su desperiostización y colocación del microseparador. Una vez extirpadas las espinosas, tanto en una zona como en otra es recomendable identificar el espacio interlaminar, muy pequeño, ya que es el punto por donde introducir la punta de la microgubia para comenzar la laminectomía. Una vez extirpada la lámina, siempre en sentido craneal, nos encontramos con el siguiente espacio interlaminar. En esta zona el ligamento amarillo es más denso y su extirpación suele acompañarse de un cierto sangrado epidural. La duramadre se abre como se describió más arriba (Figura 6-7).

Una vez realizada la técnica experimental se procede al cierre por planos. Generalmente la duramadre, si se ha abierto, se deja sin cerrar, cubierta de una capa de material hemostático. Si se desea cerrar, es necesario aplicar puntos sueltos de 10/0. La capa muscular se cierra con puntos sueltos de 4/0 y la piel con seda 2/0 o con grapas metálicas.

A continuación vamos a describir las técnicas más frecuentemente llevadas a cabo en nuestro laboratorio, agrupándolas en técnicas sobre la médula, raíces y colocación de catéteres para administración aguda y crónica de fármacos.

## **B.2. Técnicas Sobre la Médula Espinal**

El modelo más frecuentemente realizado es el trauma medular, que pretende reproducir la situación que sigue a un traumatismo raquímedular, para estudiar los fenómenos fisiopatológicos que suceden o el papel de determinados tratamientos. Habitualmente se persigue conseguir una lesión aguda completa, aunque algunos modelos desarrollan situaciones de evolución más subaguda. Los métodos de lesión medular pueden ser estáticos o dinámicos, habiendo sido revisada la literatura al respecto recientemente por Fernández et al (1991).

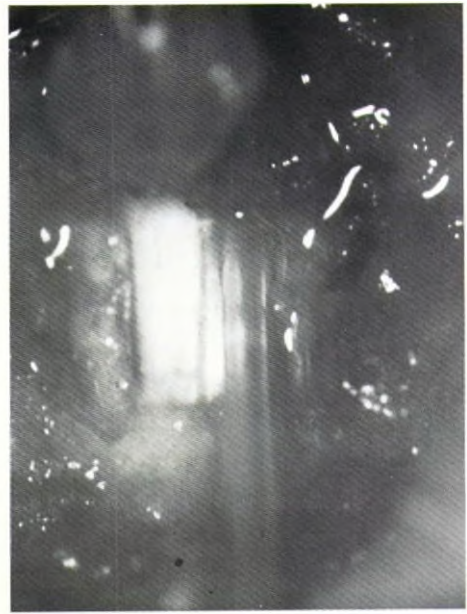
Existen diversos medios de lesión estática. El más empleado consiste en la exposición del segmento medular seleccionado para lesionar y, respetando la integridad de la duramadre, aplicar un clip vascular o de aneurisma de presión conocida un determinado tiempo. En las diferentes experiencias se han descrito presiones en el rango de 8 a 180 g aplicadas una o varias veces y tiempos variables desde 5 segundos a 5 horas. Otros sistemas de compresión estática son la colocación intrarraquídea de balones que son posteriormente hinchados o de materiales que se dejan en el espacio epidural, pero que posteriormente aumentan su volumen por un mecanismo osmótico.

Como método de compresión dinámica se emplea el sistema de dejar caer desde una altura determinada un peso conocido. La médula está expuesta con la duramadre conservada. Este método permite variar y conocer exactamente la carga aplicada sobre la médula, al poder variar la altura de caída, la masa del peso y la superficie de contacto del mismo con la médula.





*Figura 6-6.- Abordaje al raquis cervical. En la fotografía de la izquierda se aprecia un espacio interlaminar liberado del ligamento amarillo y cómo a través de la duramadre se transparenta la médula con sus vasos dorsales. En la derecha se muestra la introducción de dos electrodos en el espacio epidural para estimulación medular.*



*Figura 6-7.- Abordaje al raquis lumbar. Se ha realizado una laminectomía y se muestra la duramadre íntegra, a través de la que se aprecia la médula, raíces y vasos espinales dorsales (izquierda). Con la pinza se está abriendo un ojal en la duramadre. En el lado derecho se observa como se ha introducido un catéter intratecal.*



Otros métodos de lesión medular incluyen mecanismos vasculares, a través de la ligadura de la aorta torácica o abdominal, transección medular, realizando un corte de la médula con tijeras, distracción o microaspiración subpial.

La lesión medular completa produce una serie de secuelas neurológicas que hace difícil el mantenimiento del animales en condiciones de supervivencia e higiene. La rata con lesión medular debe mantenerse en una habitación a temperatura controlada de 28-30 °C y realizar el vaciado manual de la vejiga tres veces al día, teniendo especial cuidado en todo lo que se refiere a la higiene y limpieza de la piel.

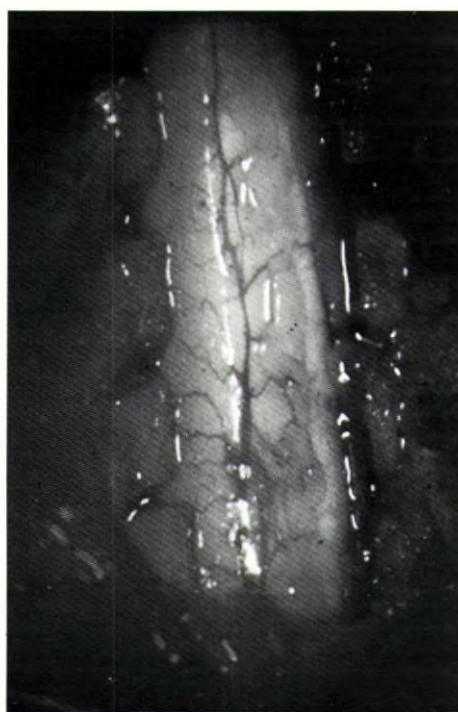
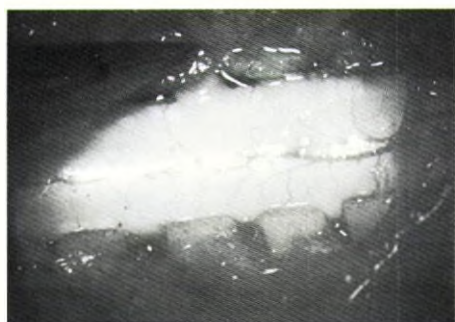
El tamaño de la médula de la rata dificulta la realización de técnicas intramedulares. La estructura de la médula de la rata es semejante a la del humano, y pueden realizarse secciones regladas de los cordones medulares posterior y anterolateral. Las reparaciones microquirúrgicas de la lesión medular se han intentado con dos técnicas diferentes. Por un lado se han empleado puentes de nervio periférico, concretamente ciático, tratando de unir ambos cabos de la médula lesionada o de salvar el defecto lesional, realizando en este caso la anastomosis unos milímetros por encima y por debajo del nivel lesional. Otras técnicas se basan en la inyección o colocación en el foco lesional de suspensiones celulares o de tejido nervioso embrionario, bien medular o cerebral. En este caso, se realiza una lesión medular traumática y, pasado un periodo de tiempo determinado según el diseño de la experiencia, se aborda el segmento lesionado y se inyecta en la médula una suspensión de células nerviosas fetales o, tras reseca el foco lesional, se rellena el defecto con tejido embrionario, procediendo ahora al cierre de la duramadre.

### B.3. Técnicas Sobre las Raíces

Las raíces espinales son objeto de abordaje microquirúrgico para su sección (rizotomía) o reparación. También deben aislarse las raíces, bien en su porción preganglionar o postganglionar, para realiza estudios neurofisiológicos.

La **rizotomía posterior cervical** es un modelo de dolor crónico por deafferentación que pretende reproducir la lesión clínica de avulsión del plexo braquial. Para ello se aborda el raquis cervical de la forma que se ha expuesto y se abre la duramadre longitudinalmente en uno de los lados. Las raíces se reconocen como unas estructuras grisáceas que cruzan transversalmente la médula en espacios regulares. Las raíces pueden cortarse limpiamente con unas tijeras de microcirugía o arrancarse de la médula usando un pequeño gancho (Figura 6-8). La sección es una lesión mas reproducible y segura, mientras que el arrancamiento reproduce mas las situaciones clínicas pero la reproductibilidad es menor, ya que son imprevisibles las lesiones que se producen en la propia médula. La denervación de toda la extremidad superior supone la sección de las raíces C5 a T1.

La **reparación de raíces** se puede hacer en las de la cola de caballo, ya que poseen un tamaño lo suficientemente grande como para permitir su manejo microquirúrgico.



**Figura 6-8.-** Abordaje al raquis cervical para rizotomía posterior. Una vez desperiostizadas las láminas se procede a su extirpación (arriba). La duramadre está abierta en la foto y retraída lateralmente con una pinza para mostrar una de las raíces dorsales. Las raíces se cortan una a una (derecha).

Una vez expuesto el nivel deseado, se procede a la apertura de la duramadre rasgándola con una aguja. Las médula suele ocupar una posición mas superficial, de forma que las radículas que salen en el nivel expuesto están mas superficiales. Para encontrar raíces de calibre adecuado hay que manipular la médula y las raíces mas pequeñas. Esta maniobra es dolorosa para la rata, que puede hacer movimientos reflejos bruscos que condicionen la lesión involuntaria de las estructuras neurológicas. En este sentido, y siempre que no interfiera con la experiencia a realizar, se recomienda bañar el espacio intradural con una solución de anestésico local de acción ultrarrápida. Las raíces se identifican a través de referencias externas o mediante estimulación, viendo la respuesta motora que caracteriza a cada una de ellas y que ha sido descrita mas arriba. La sección de una raíz puede repararse de diferentes formas. La sutura terminoterminal directa con hilo de 10/0 se consigue aplicando un punto en cada lado, aun a pesar de que las raíces carecen de perineuro. Una técnica alternativa consiste en envolver los cabos de a raíz seccionada con una capa de pared arterial o venosa, que se suturan formando una vaina para mantener



aproximados los extremos de la raíz. Finalmente, otra técnica de reparación es el empleo de injertos de nervio, siendo el nervio sural el más recomendable por poseer una calibre semejante al de las raíces (Figura 6-9).

#### **B.4. Colocación de Catéteres para Infusión: Bombas Osmóticas**

En los últimos años se ha desarrollado la tecnología suficiente como para asegurar la administración crónica de fármacos cerca del sistema nervioso central a través de catéteres espinales, lo que ha supuesto que gran cantidad de fármacos ya conocidos y otros nuevos hayan sido testados a través de esta nueva vía de administración en animales.

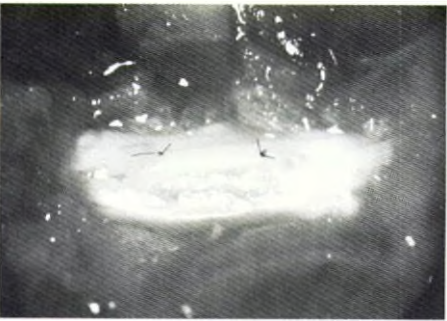
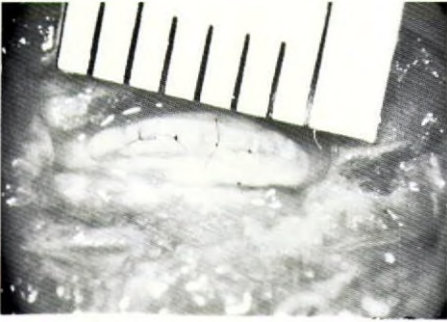
En principio es conveniente separar las técnicas según que el extremo del catéter se encuentre en el espacio subaracnoideo (vía intratecal) o espacio epidural (vía epidural). También es conveniente distinguir técnicas de administración continua, que pueden ser a través de bombas implantadas o externas, o de administración en bolos.

Cuando se decide colocar el catéter en el espacio epidural se hace una laminectomía unos dos o tres espacios por encima o debajo del nivel deseado y simplemente se desliza la punta del catéter entre la duramadre y la cara interna de los arcos neurales, en sentido caudal o craneal y en la distancia adecuada. Para colocarlo en el espacio intratecal se abre un pequeño ojal en la duramadre y se desliza el catéter en sentido caudal, para seguir así la dirección de las raíces espinales. Nosotros utilizamos un catéter de polivinilo no colapsable y de 0.58 mm de diámetro interno y 0.99 mm de diámetro externo (Figura 6-7).

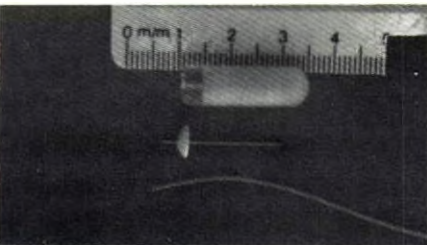
El catéter se tuneliza por el tejido celular subcutáneo hasta exteriorizarlo a través de una contraabertura situada en el pericráneo, para que la rata no sea capaz de alcanzarlo, cerrándolo en este caso aplicando un poco de calor. Terminada la cirugía se deja el animal durante dos o tres días antes de realizar la administración de la droga, con la finalidad de detectar del desarrollo de eventuales déficits neurológicos que suponen rechazar el animal que los sufre. Estos animales deben ser rechazados para las ulteriores experiencias y sacrificados, tratando de identificar en la necropsia las razones del daño neurológico con el fin de ir perfeccionando la técnica.

En caso de administración en bolos, se toma el animal y se envuelve en un paño verde, dejando exteriorizado el catéter, cuya punta se corta y se acopla a una aguja fina conectada a una jeringa de Hamilton (Hamilton Microliter Syringes, Suiza) con la que se inyecta la droga. En el cálculo de la dosis se tendrá en cuenta el espacio muerto del catéter o se lavará este después con suero fisiológico. El volumen total a inyectar no debe sobrepasar los 50  $\mu$ l. Posteriormente se cierra de nuevo la punta del catéter con calor y el animal queda libre. Cuando se quiere una administración continua es necesario dejar conectado el animal al sistema de infusión externa, generalmente una bomba (Harvard Syringe Pumps). En este caso el problema es la torsión que el catéter puede sufrir con los movimientos libres de la rata, habiéndose diseñado para ello ingeniosos sistemas mecánicos.





**Figura 6-9.-** Reparación de las raíces de la cola de caballo. Arriba se muestra una sutura terminoterminal, con dos puntos de 10/0. En el centro se ha reparado con una vaina arterial, que se ha cerrado con cuatro puntos de 10/0. Abajo se ha hecho la reparación con un injerto de nervio sural, unido a cada uno de los cabos de la raíz con un punto de 10/0.



**Figura 6-10.-** Fotografía que muestra los componentes de la minibomba osmótica ALZET: cuerpo con el depósito; tubo central y cierre; catéter.

A veces el catéter se conecta a una bomba de infusión implantada, existiendo a este efecto en el mercado las bombas mini-osmóticas ALZET (ALZA Corp, USA) (Figura 6-10). La bomba consiste en un pequeño depósito de material impermeable y flexible, rodeado de un material osmótico y envuelto todo ello de una capa rígida de material semipermeable. El depósito se llena de la solución deseada y se implanta en el tejido celular subcutáneo conectada al catéter espinal. El agua intersticial penetra a través de la membrana externa e hincha el material osmótico, que de esta forma exprime el contenido del depósito que sale por el catéter. El flujo es constante y depende del modelo de bomba, con lo que la duración de liberación depende del volumen de la misma. Así existen modelos de 200  $\mu$ l y 2 ml, con flujos nominales de entre 0.5  $\mu$ l/h y 10  $\mu$ l/h y duraciones de entre 1 y 4 semanas. Cuando la bomba se vacía, si se quiere mantener la administración, se procede al recambio de la misma por otra llena.

El mayor problema de los catéteres mantenidos crónicamente es que el tubo se desliza saliéndose de su localización espinal, por lo que es conveniente sujetarlo firmemente a la musculatura paravertebral. Otro problema es que la fibrosis que indefectiblemente se desarrolla alrededor del catéter sea capaz de ocluir su boca o, en otro caso, impedir la difusión de la droga. En general, el espacio intratecal no reacciona con fibrosis ante la presencia del cuerpo extraño que supone el catéter, mientras que el espacio epidural es más activo en este sentido, y no pocas veces la supuesta tolerancia a una droga administrada por vía epidural no es más que la consecuencia de una fibrosis. Un tercer problema es la posibilidad de que la introducción del catéter o su presencia induzcan déficits neurológicos, que deben ser despitados en cada caso.

#### IV. VALORACION DE LAS TECNICAS

Sólo vamos a comentar el control de la sintomatología clínica en el animal con lesión neurológica y los controles de funcionamiento de los catéteres espinales.

##### A. Valoración del Daño Neurológico

La lesión medular se valora mediante la exploración clínica del animal. La intensidad de la lesión depende directamente de la intensidad del traumatismo. El método más habitual de control evolutivo de la lesión medular es el **test del plano inclinado**, que consiste en colocar al animal en un tablero rectangular que puede inclinarse sobre la horizontal con una bisagra y que está dotado de un goniómetro para conocer la inclinación exacta. Una vez el animal se acostumbra al tablero se procede a levantarlo en incrementos de 5° midiendo el último ángulo en el que el animal se mantiene sin resbalarse más de un



tiempo determinado (5 segundos). Este test se realiza semanalmente y se comparan los resultados con los grupos controles. Así, por ejemplo, la lesión con un clip de 17 g produce una paraplejía con recuperación de la función vesical en una semana, desarrollo de una paraparesia espástica y se mantienen en el plano inclinado entre 55° y 65°. Si la compresión se hace con un clip de 53 g desarrollan una paraplejía completa, sin evolución favorable y sólo se mantienen entre 40° y 45°.

La lesión radicular es de mas difícil valoración, apareciendo los **signos de afectación radicular** motora o sensitiva. Cuando la lesión es de una sola raíz se pueden obtener datos a través de una exploración dirigida a reproducir los datos expuestos mas arriba, cuando se describieron las funciones sensitivas y motoras de las principales raíces espinales. Si la lesión es de varias raíces motoras se produce una parálisis de la extremidad suma de las parálisis de las raíces individuales.

Muy típico tras la rizotomía posterior es el desarrollo de un patrón conductual que tiende al rascado y mordisqueo de la zona deaferentada, que acaba en la automutilación de la misma. Esta conducta se conoce con el nombre de '**autotomía**' y se ha considerado al hablar de las lesiones de los nervios periféricos. Su aparición se desarrolla como consecuencia de las sensaciones anormales dolorosas o al menos disestésicas, que el animal siente como consecuencia de la deaferentación y que refiere a la zona cutánea anestésica. Ocasionalmente se producen lesiones 'en espejo'. La intensidad de la autotomía se cuantifica por medio de una escala descrita por Wall et al (1979):

- 1 punto por la autotomía de una o mas uñas
- 1 punto por la autotomía de cada media falange
- 1 punto por la autotomía del carpo
- 1 punto por la autotomía del metacarpo,

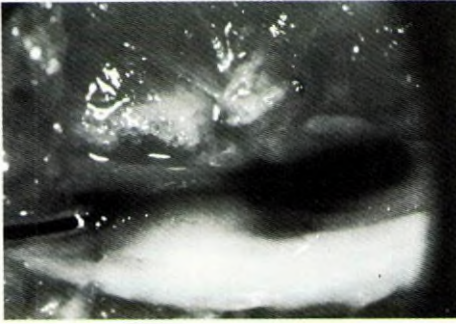
de forma que la autotomía máxima en la extremidad superior es de 11 puntos (tiene cuatro dedos).

## **B. Control Funcional del Catéter Espinal**

Una vez colocado el catéter espinal hemos de asegurarnos que está en el lugar deseado y permeable. Cuando se coloca intradural es normal el relleno del mismo con líquido cefalorraquídeo limpio o ligeramente teñido de sangre. Algunos autores recomiendan la inyección de una pequeña cantidad de un anestésico local, que produce una parálisis transitoria. Sin embargo, nosotros preferimos hacer los controles después de haber realizado la experiencia. En este sentido, los controles de una correcta localización y funcionalidad del sistema se hacen en las diferentes fases de la experiencia:

- la aparición de cualquier déficit neurológico, por pequeño que sea, debe hacer rechazar el animal como válido para experiencias ulteriores.





**Figura 6-11.-** Fotografía que muestra el resultado de la inyección de azul de Evans a través de un catéter intratecal lumbar. Se aprecia, en la necropsia, el teñido de la cola de caballo indicando la permeabilidad del mismo.

- en caso de inyección directa no debe existir una resistencia anómala ni dolor al introducir la solución.
- cuando la droga administrada tenga un efecto conocido, la ausencia del mismo es signo de alguna anomalía.
- al finalizar la experiencia se puede administrar una sobredosis de la droga testada si conocemos su efecto o, en caso contrario, una dosis de anestesia local.
- inmediatamente antes del sacrificio se inyectará una solución de un colorante (azul de Evans 1%), estudiando la distribución del mismo unos minutos más tarde durante la necropsia (Figura 6-11).
- obtener de forma aleatoria o sistemática piezas del raquis por donde se encuentra el catéter para hacer un estudio histológico rutinario con hematoxilina y eosina y detectar problemas groseros de la médula, raíces por compresión, fibrosis o infección.

## REFERENCIAS

- Bing Z, Cesselin F, Bourgoïn S, Clot AM, Hamon M, LeBars D. Acupuncture-like stimulation induces a heterosegmental release of Met-enkephalin-like material in the rat spinal cord. *Pain* 47:71-77, 1991.
- Fernandez E, Pallini R, Marchese E, Talamonti G. Experimental studies on spinal cord injuries in the last fifteen years. *Neurol Res* 13: 138-159, 1991.
- Giner Nogueras M, Figuera Felip J, García Borobia F, Llorís Carsí JM. Técnica de infusión intravenosa continua en ratas en libertad. *Res Surg, supl 5*: 3-9, 1989.
- González-Darder JM, Barberá J, Durán J, García-Vázquez F. Medida del dolor en modelos animales de dolor por deaferentación. *Arch de Neurobiol* 51: 3-7, 1988
- González-Darder, Gómez-Cárdenas E, Gil-Salú JL. Cateterización microquirúrgica del espacio intratecal de la rata para infusión crónica de fármacos. *Rev Esp Anestesiología Reanim* 36: 153-156, 1989.
- González-Darder, Gómez-Cárdenas E, Guerrero-Cherino M, Gil-Salú JL. Administración intratecal de antiepilépticos. Estudio experimental. *Rev Esp Neurol* 5: 82-86, 1990.
- González-Darder, Gómez-Cárdenas E, Ruz-Franzi I, Bernal-Cerezo J, Gil-Salú JL, Segura-Pastor D, de la Orden E. Modelos animales de dolor crónico por deaferentación. *Res Surg, supl 5*: 57-64, 1990.
- González-Darder, Gómez-Cárdenas E, Segura-Pastor D, Carrasco M. Acción analgésica y anticonvulsivante del midazolam administrado por vía intratecal en la rata. *Rev Esp Anestesiología Reanim* 37: 261-264, 1990
- Greene EC. *Anatomy of the Rat*. New York, London. Hafner Pu Co, 1963.
- Lombard, Nashold BS Jr, Albé-Fessard D, Salman N, Skar C. Deafferentation hypersensitivity in the rat after dorsal rhizotomy: a possible animal model of chronic pain. *Pain* 6: 163-174, 1979.
- Moyer EK, Kimmel DL. The repair of severed motor and sensory spinal nerve roots by the arterial sleeve method for anastomosis. *J Comp Neurol* 88: 285-317, 1948.
- Paccinos G, Watson C. *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates (2ª ed)*. San Diego, Academic Press. 1986.
- Pallini R, Fernández E, Gangitano C, del Fà A, Oliveri-Sangiaco, Sbriccoli A. Studies on embryonic transplants to the transected spinal cord rats. *J Neurosurg* 70: 454-462, 1989.
- Roldán P, Broseta J, González-Darder JM, Maruenda J, Barcia-Salorio JL. Modelo de dolor central por avulsión del plexo braquial. Estudio experimental en la rata. *Archiv de Neurobiol* 45: 225-236, 1982.
- Rowett HGQ. *Guías de disección. III, La Rata*. Barcelona. Ediciones Urania, 1976.
- Suh YS, Kyungsoon C, Coggeshall E. A study of axonal diameters and areas in lumbosacral roots and nerves in the rat. *J Comp Neurol* 222: 473-481, 1984.
- Wall PD, Devor M, Inval R, Scadding JW, Schonfeld D, Seltzer Z, Tomkiewicz MM. Autotomy following peripheral nerve lesions: experimental anesthesia dolorosa. *Pain* 7: 103-113, 1979.
- Yaksh TL, Rudy TA. Chronic catheterization of the spinal subarachnoid space. *Physiol Behav* 17: 1031-1036, 1976.





# 7

## TECNICAS SOBRE EL CRANEO Y EL CEREBRO

---

- I. Introducción
  - II. Anatomía Topográfica del Cráneo y Cerebro
  - III. Abordajes al Espacio Intracraneal
    - A. Agujero de Trépano y Craniectomía
    - B. Hipofisectomía
    - C. Pinealectomía
    - D. Abordaje a los Senos Venosos Durales
    - E. Modelos de Isquemia Cerebral Difusa
  - IV. Valoración de las Técnicas
    - A. Valoración del Daño Neurológico
    - B. Valoración de la Isquemia Cerebral
-



## I. INTRODUCCION

La mayor parte de técnicas que suponen el acceso al espacio intracraneal de la rata se realizan utilizando una técnica estereotáctica, debido al pequeño tamaño del cerebro de la rata y a la necesidad de realizar una técnica reproducible. Los detalles de esta técnica serán descritos en el capítulo siguiente. Sin embargo, ocasionalmente se realizan abordajes a cielo abierto y es sobre ellos sobre los que profundizaremos.

## II. ANATOMIA TOPOGRAFICA DEL CRANEO Y CEREBRO

El cerebro de la rata se caracteriza por la ausencia de circunvoluciones y por tener unos voluminosos bulbos olfatorios, mientras que en la base destaca el tamaño del nervio trigémino y de la glándula hipofisaria.

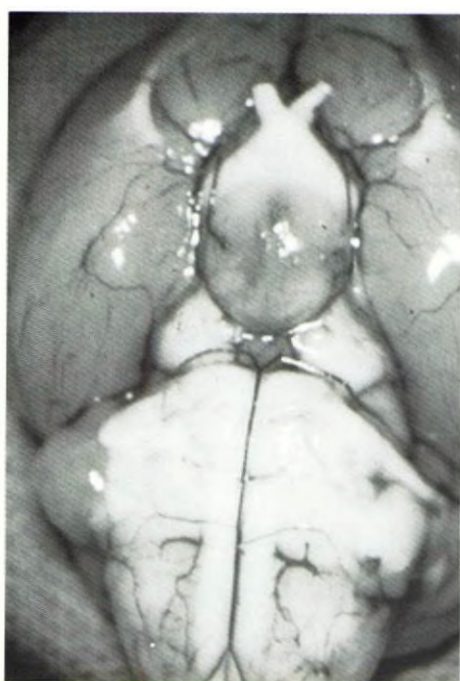
Cuando se examina el encéfalo de la rata por su cara dorsal antes de que se haya retirado la duramadre, se aprecian el seno longitudinal superior que recorre la línea media entre los dos hemisferios y se divide, en la zona de transición tentorial en dos senos transversos. A lo largo de todo su recorrido estos senos reciben afluentes venosos de la corteza cerebral y cerebelosa, en un trayecto generalmente perpendicular. Cuando se retira la duramadre se aprecia que la superficie cerebral carece de surcos, mientras que el cerebelo tiene abundantes cisuras (Figura 7-1). En este último se identifica una porción medial o vermis, dos porciones laterales o flóculos y, finalmente, dos expansiones mas laterales o paraflóculos. Levantando cuidadosamente el vermis se entra en el IV ventrículo a través de una membrana. En la parte mas posterior de la cisura interhemisférica y en la confluencia del seno sagital con los senos transversos, se encuentra la glándula pineal, de unos 1-2 mm de diámetro y de aspecto translúcido.

La base del cerebro ofrece muchas más estructuras de interés (Figura 7-2). En la línea media se halla la hipófisis, de color rosáceo y alojada en la silla turca, por lo que generalmente queda en el cráneo al romperse el tallo hipofisario. Por delante se encuentra el quiasma óptico que se divide en los dos nervios ópticos. A ambos lados de la hipófisis destaca el nervio trigémino, con su ganglio y sus tres ramas terminales, muy voluminosas





*Figura 7-1.- Visión dorsal del cerebro de la rata (ver texto).*



*Figura 7-2.- Visión basal del cerebro de la rata (ver texto).*

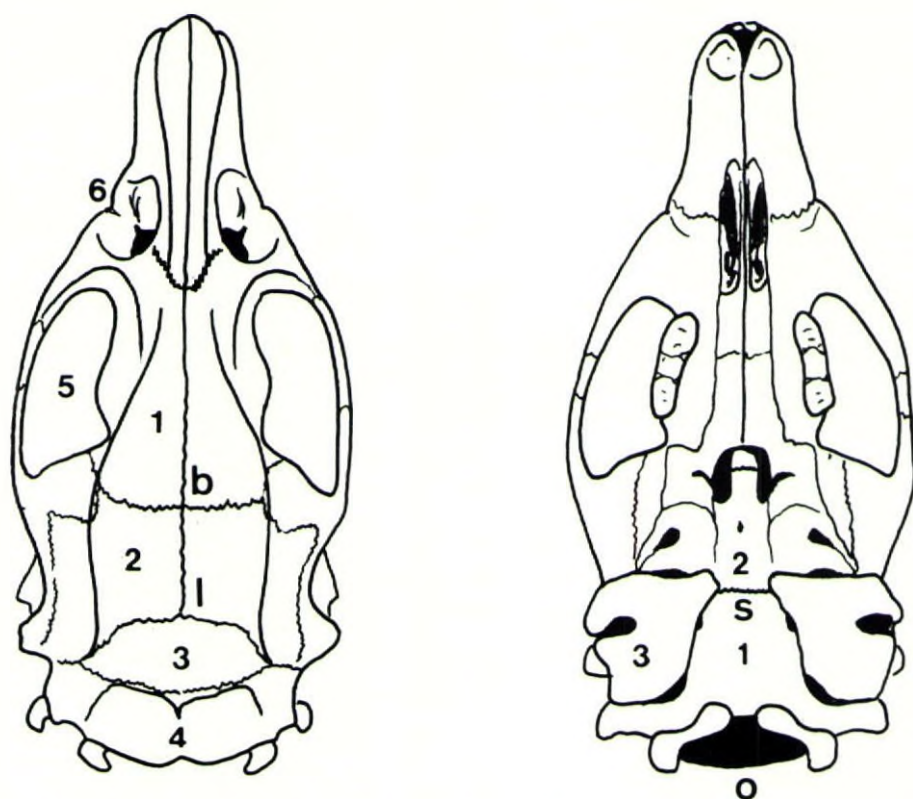
la oftálmica y la mandibular y menos desarrollada la maxilar. El resto de pares craneales se observan emergiendo del tronco, excepto los filetes olfatorios, que lo hacen de una amplia zona en el extremo anterior de los bulbos olfatorios. Los pares VII y VIII nacen de la parte más superior de la protuberancia, por delante del paraflóculo. Los pares IX, X y XI emergen del bulbo por su parte más lateral, mientras que el XII lo hace más medialmente. Sobre la superficie del tronco se reconoce la arteria basilar, con su división en las dos cerebrales posteriores.

El cráneo de la rata consta de 41 huesos, unos de osificación membranosa y otros de osificación cartilaginosa, respondiendo su esquema general al del cráneo de los mamíferos (Figura 7-3). La calota craneal está formada por los huesos frontales, parietales, interparietal y occipital, pudiendo identificarse una línea de sutura medial longitudinal (sutura sagital) entre ambos frontales y ambos parietales y dos líneas de sutura transversales, una más anterior (sutura coronal) entre frontales y parietales y otra posterior (sutura transversa) entre los parietales y el interparietal. Más atrás existe una tercera línea de sutura transversal entre el interparietal y el occipital. El punto de cruce entre la sutura sagital y la coronal es el bregma, punto de referencia de gran interés, mientras que la intersección entre la sutura sagital y la transversa es lambda. El cráneo de la rata es relativamente estrecho en relación al tamaño de la cabeza, ya que a ambos lados están las fosas cigomático-temporales, ocupadas por la potente musculatura masticatoria. La base del cráneo está formada en la línea media por el hueso occipital con el agujero magno y el basiesfenoides, conteniendo este último la silla turca. Ambos huesos están separados por una línea de sutura. A ambos lados del occipital, y separadas por el agujero rasgado posterior, destacan las llamadas bullas timpánicas con el agujero auditivo externo, mientras que a los lados del basiesfenoides se encuentran varios orificios de salida de pares craneales o entrada de vasos.

Las suturas sagital y transversa marcan el trayecto de los senos longitudinal y transverso respectivamente. El acceso al lóbulo frontal se hace por delante de la sutura coronal y el acceso al parieto-occipital entre las suturas coronal y transversa. El bregma es un punto básico en las referencias craneométricas, y en algunos atlas estereotácticos se emplea como referencia para el punto cero. Así, el acceso al ventrículo lateral se hace a través de un trépano localizado 1.5-2 mm lateral y posterior al bregma, penetrando perpendicularmente en el cerebro unos 3.5-4 mm.

El principal aporte sanguíneo al cerebro de la rata se hace a través de la arteria cerebral media. Este vaso puede verse recorriendo la superficie externa de cada hemisferio, emitiendo tres ramas ascendentes importantes para acabar en una rama terminal. La dependencia vascular del cerebro de la rata se puede esquematizar de la siguiente forma. La zona dependiente de la arteria cerebral media corresponde a la corteza frontoparietal y a la porción dorsolateral del caudado y putamen. En relación a referencias externas, correspondería a unos 2 mm por delante y por detrás del plano transversal que pasara por bregma. La zona dependiente de la arteria cerebral anterior es predominantemente el





**Figura 7-3.-** Esquemas que muestran la calota craneal de la rata (izquierda) y una visión basal del cráneo (derecha). En la calota destacan los huesos frontales (1), parietales (2), interparietal (3) y occipital (4) y las fosas cigmático-masetera (5) y orbitaria (6). Se han señalado los puntos craneométricos bregma (b) y lambda (l). En la base se ha destacado el occipital (1), con el agujero magno (o), y el basiesfenoides (2), separado del anterior por una línea de sutura (s). A ambos lados están las bullas timpánicas con los agujeros auditivos externos (3).

cortex cingular anterior. La parte mas posterior del cerebro depende del aporte a través de las cerebrales posteriores. Existe una buena circulación compensatoria entre los sistemas vertebrobasilar y carotídeo de uno y otro lado.

### III. ABORDAJE AL ESPACIO INTRACRANEAL

El abordaje al espacio intracraneal se puede hacer a cielo abierto o utilizando una técnica estereotáctica, y ello depende de la técnica experimental que se vaya a realizar. En todo caso, la técnica estereotáctica supone la realización de al menos un agujero de trépano, mientras que el abordaje a cielo abierto implica la realización de una craniectomía.



## **A. Agujero de Trépano y Craniectomía**

Cualquier abordaje al espacio intracraneal supone el atravesar la caja ósea, siendo preciso en todo caso que la cabeza se encuentre bien fija y usar algún sistema mecánico de perforación. Existe un sistema para fijar la cabeza mediante la sujeción con una pinza del hocico del animal apoyado en la base de los incisivos superiores. El brazo de la pinza está provisto de una rótula que permite orientar la cabeza de la forma mas adecuada. Otro sistema es sujetar el animal es un sistema estereotáctico, colocando además de la pinza en el hocico dos barras insertadas en los conductos auditivos externos. Ahora la sujeción es mayor, pero el acceso se limita a la parte superior del cráneo. Para atravesar el hueso ha de utilizarse motor provisto de fresa, bien de dentista o, más económico, de marquetería. La fresa debe tener un diámetro de 1-1.5 mm.

Para abordar el cráneo se realiza una incisión longitudinal desde la línea interocular hasta la eminencia occipital externa. Se separan los bordes de la herida y se desperiostiza el hueso hasta llegar a las fosas temporales donde se insertan los músculos temporales. En esta zona se suele producir un abundante sangrado perióstico. Se identifican inmediatamente las suturas sagital, coronal y transversa, que se usan como referencias topográficas. Para hacer uno o varios trépanos se emplea el motor con la fresa o, si se prefiere, se pueden hacer rotando suavemente sobre el cráneo un punzón de diámetro adecuado. En el caso de querer hacer una craniectomía es imprescindible la fresa procediendo a erosionar progresivamente toda la superficie de la craniectomía planeada. El campo se lava frecuentemente con suero frío para evitar la lesión de la corteza por el calor. Las hemorragias procedentes del hueso se controlan colocando pequeñas bolitas de cera de abeja. Pronto queda una fina capa de hueso que deja transparentar la superficie cerebral. Esta última capa se extirpa con la ayuda de unas pinzas de relojero. El trabajo en la zona de las suturas y encima de los senos venosos puede ser particularmente comprometido. Finalmente, la duramadre se abre con la punta de una aguja.

Realizada la técnica intracraneal deseada la duramadre puede cerrarse con puntos sueltos de hilo de 10/0, mientras que el defecto óseo se rellena con cemento dental o con una capa de silicona. La piel se cierra con puntos sueltos de seda o grapas metálicas.

## **B. Hipofisectomía**

Hay en el mercado ratas hipofisectomizadas que pueden obtenerse de diferentes casas comerciales, pero a veces puede ser interesante por parte del investigador realizar una hipofisectomía para obtener material de estudio o con otra finalidad. Para ello hay dos vías de abordaje a la glándula hipofisaria, bien a través de la base del cráneo usando una vía parafaríngea o a través del oído.

Para el abordaje parafaríngeo se coloca la rata en decúbito supino con la cabeza y cuello extendidos. Se realiza una incisión medial longitudinal y se identifica la tráquea a través de la musculatura pretraqueal, concretamente entre los dos músculos esternohioideos. Se procede en este punto a la colocación de una cánula traqueal ya que posteriormente se distorsionará la tráquea, con el consiguiente peligro de aumentar las secreciones. El acceso a la base del cráneo se hace entonces separando lateralmente el esternohioideo y a través del omohioideo, justo por debajo de la zona fibrosa del músculo digástrico, por donde se fija al hueso hioides. Una vez se llega al hueso se procede a su desperiostización hasta identificar una línea de sutura transversal, a menudo de color azulado, retrayendo lateralmente todos los músculos y estructuras. Esta línea es la que existe entre el basiesfenoides y el occipital. Se introduce ahora la fresa, haciendo un orificio justamente en la línea media y con 2/3 del mismo por delante de la línea de sutura transversal. La extirpación de hueso se completa hasta identificar la hipófisis, cubierta por una fina membrana meníngea. La glándula se extirpa con aspiración o curetaje, debiéndose controlar la hemorragia a través del tallo con coagulación bipolar o, mejor, aplicando una pequeña cantidad de material hemostático.

El abordaje intra-auricular es de tipo estereotáctico. Se coloca para ello a la rata en un sistema de sujeción con sendas barras insertadas en los conductos auditivos externos y con los incisivos superiores sujetos. Para la mejor colocación de las barras auriculares se puede cortar verticalmente el cartílago del meato auricular externo. Las barras auriculares están perforadas permitiendo el paso de una aguja que se introduce hasta el hueso periótico, que al ser muy delgado se atraviesa con facilidad girando suavemente la aguja. La longitud de la aguja se ha medido de forma que sepamos cuando su punta llega a la línea media, momento en el que procedemos a la aspiración de la hipófisis.

Aunque los animales hipofisectomizados pueden sobrevivir durante meses, es necesario el cuidar su postoperatorio inmediato mediante la administración de corticoides y ofrecer suero glucosado como líquido de bebida durante unos días después de la operación.

### **C. Pinealectomía**

El animal se coloca en decúbito prono y con la cabeza fija. Se hace una incisión medial longitudinal y se identifican la sutura sagital y transversal y posteriormente una craniectomía en el ángulo entre ambas, teniendo cuidado de no lesionar el seno longitudinal en la línea media ni el transversal caudalmente. Luego se abre la duramadre en L en el ángulo entre ambos senos y se retrae el polo occipital abordando así la glándula para ser extirpada. La pinealectomía no produce trastornos de gravedad vital o funcional en la rata.



## D. Abordaje a los Senos Venosos Durales

Se hace a través de una craniectomía centrada sobre el trayecto de los mismos. La gran delgadez de las paredes del seno obliga a manejar el hueso que los cubre con gran delicadeza, ya que de lo contrario se producen hemorragias profusas. Una vez descubierto el seno se procede a realizar dos incisiones longitudinales de la duramadre paralelas a su trayecto con la finalidad de colocar un par de microclips y excluir la circulación. Sin embargo, el aporte sanguíneo a través de las venas cerebrales puede mantener un molesto sangrado en la zona de seno excluida y puede ser necesario coagularlas. El seno venoso puede ser sometido a ligadura o reparación directa o mediante la colocación de parches.

## E. Modelos de Isquemia Cerebral Difusa y Focal

Los **modelos de isquemia difusa** se hacen por la ligadura de la carótida común o interna. Se trata de modelos bastante irregulares debido a la capacidad de desarrollo de circulación colateral. Por ello, a veces se hacen modelos en varias fases. Así, puede iniciarse con la coagulación de ambas arterias vertebrales a nivel cervical y unos días después asociar la ligadura de una o ambas carótidas. Otras veces, con la finalidad de exagerar los resultados de la isquemia, el periodo de oclusión es seguido de una fase de reperfusión. Así, en nuestra experiencia es suficiente la oclusión carotídea bilateral de 60 minutos seguida de una fase de reperfusión de 30 minutos para conseguir un edema cerebral isquémico difuso significativo. Aisladamente, la ligadura de una carótida común reduce el flujo en aproximadamente un 50%, mientras que la ligadura de ambas aumenta el déficit en un 20 %.

Los **modelos de isquemia focal** se consiguen generalmente por medio de la oclusión de la arteria cerebral media. El abordaje directo a la arteria cerebral media de la rata para su oclusión se hace fijando la cabeza en un soporte y colocándola en posición lateral. Se rasura la piel y se hace una incisión vertical de unos 2 cm en el punto medio entre el conducto auditivo externo y el canto del ojo. Se separa el músculo temporal hasta llegar a la fosa infratemporal, practicando a este nivel una pequeña craniectomía de unos 2.5 mm de diámetro con una fresa. La dura se abre en cruz y se encuentra la arteria cerebral media cruzando a este nivel el tracto olfatorio, en un punto inmediatamente anterior a la zona desde donde emergen las arterias lenticuloestriadas. La arteria puede entonces ocluirse con una ligadura o con coagulación bipolar, teniendo cuidado de no lesionar la corteza subyacente.

La oclusión de la arteria cerebral media se puede conseguir también a través de un abordaje extracraneal. Para ello se disecciona en el cuello la carótida primitiva y su bifurcación, coagulando la carótida externa unos 3 mm distalmente. Se colocan sendos microclips en la carótida común e interna y se hace una pequeña arteriotomía en la



externa a través de la que se introduce un hilo de silastic de 2/0 con una marca a los 35 mm de la punta. Se cierra la arteriotomía y se abre el clip de la carótida interna, haciendo progresar el hilo de silastic cranealmente, de forma que cuando se han metido los 35 mm marcados el extremo se halla en la entrada de la cerebral media provocando su trombosis en unos minutos.

#### IV. VALORACION DE LAS TECNICAS

Es evidentemente difícil hacer un repaso siquiera somero de las diferentes formas de evaluar el resultado de las técnicas experimentales que pueden realizarse a nivel intracraneal. Solo vamos a tratar más detenidamente la forma de valorar déficits neurológicos en la rata y la valoración de los resultados de la isquemia cerebral.

##### A. Valoración del Daño Neurológico

Es muy difícil obtener datos objetivos secundarios a la lesión neurológica encefálica en la rata y así cada autor describe una escala subjetiva de puntos, más o menos compleja, y que habitualmente modifica parcialmente alguna escala anterior. En general se valora la marcha, respuesta a estímulos dolorosos y nivel de conciencia, asociando a veces la respuesta pupilar. Una escala bastante completa y que puede servir de guía fue descrita en 1986 por Baskin et al para estudiar los déficits neurológicos que aparecen en el gato secundarios a la isquemia. La escala es como sigue:

a. Función motora:

- marcha normal y sin déficits	6
- marcha anormal, con hemiparesia	5
- marcha dificultosa, con hemiparesia	4
- marcha imposible, con hemiparesia	3
- marcha imposible, con hemiparesia severa	2
- marcha imposible, con hemiplegia	1

b. Función sensitiva:

- respuesta adecuada a estímulo táctil y doloroso	5
- respuesta adecuada sólo a estímulo doloroso	4
- respuesta inadecuada a estímulo doloroso	3
- respuesta en flexión a estímulo doloroso	2
- sin respuesta a estímulo doloroso	1

c. Nivel de conciencia:

- despierto y alerta	5
- despierto y alerta, sin movimiento espontáneo	4
- obnubilado, responde solo a estímulos dolorosos	3
- estuporoso, responde poco a estímulos dolorosos	2
- comatoso, sin respuesta a estímulos dolorosos	1

d. Respuesta pupilar:

- pupila homolateral reactiva a la luz	2
- pupila homolateral no reactiva a la luz	1

Una escala de valoración mucho mas sencilla se basa en el hecho de que cuando la rata sufre una hemiparesia tiende a caminar en círculos, debido al desequilibrio de la musculatura de las extremidades. Así, la escala de Bederson et al (1986) tiene sólo cuatro grados:

Grado 0: sin déficits observables

Grado 1: pata anterior en flexión

Grado 2: disminución de la resistencia del animal cuando es empujado lateralmente, pero sin marcha circular

Grado 3: igual al grado 2, pero con marcha circular.

Estas escalas se repiten de forma periódica en todos los animales y se valoran los cambios en la puntuación total. Las comparaciones entre los animales se hacen con estudios estadísticos no paramétricos (test de Wilcoxon para datos apareados o test de Mann-Whitney para datos no apareados).

### Valoración de la Isquemia Cerebral

Aparte de la valoración neurológica, anteriormente descrita, el desarrollo de cualquier técnica de isquemia cerebral puede valorarse desde diferentes puntos de vista. Seguidamente vamos a describir los más elementales, comunes a la mayor parte de los diseños experimentales.

La valoración de la presencia y extensión de la zona de isquemia se hace tras el sacrificio del animal. Primero se extrae con rapidez el cerebro y se secciona en lonchas de unos 2 mm de espesor, cortadas en el plano coronal. Las piezas se sumergen durante 30 minutos a 37°C en una solución al 2% de **cloruro de 2'-3'-5'-trifenil-2H-tetrazolio (TTC)**. Las piezas se observan entonces y la zona teñida de rojo corresponde al área lesionada. Como las piezas pueden procesarse luego para un estudio histológico



convencional, es conveniente fotografiarlas o realizar al menos un detallado esquema de la zona de infarto.

El **estudio histológico** rutinario con hematoxilina y eosina (H&E) muestra siempre una zona central lesionada, rodeada de un área de penumbra intermedia hasta la zona de normalidad. Se han descrito clasificaciones para cuantificar la intensidad del daño neuronal, pudiendo ser de interés la propuesta por Marinov et al (1991):

Lesión tipo I: sin cambios o muy escasos en el núcleo, con la sustancia de Nissl localizada en la periferia de la célula.

Lesión tipo II: células hinchadas y pálidas, con citoplasma acuoso y sustancia de Nissl de localización perinuclear.

Lesión tipo III: células arrugadas, con citoplasma denso y núcleo pinocítico, rodeadas de espacios vacíos.

Lesión tipo IV: neuronas muy lesionadas, con citoplasma oscuro y núcleo inidentificable.

Una consecuencia directa de la isquemia es el edema cerebral con hinchazón de los procesos neurogliales y aumento del agua en el espacio extracelular. Esto puede ser identificado con técnicas histológicas convencionales y es lo que se llama 'status spongiosus', pero resulta mas fácilmente cuantificable a través del estudio del **contenido en agua del tejido cerebral**. Las dos técnicas mas empleadas son la comparación entre peso seco y peso húmedo y la microgravimetría.

La técnica mas sencilla consiste en pesar en fresco una porción de cerebro de la zona problema y otra contralateral de control, para volver a pesarla después de secarla manteniendola en un horno a 100°C durante unas 24 horas. El % de agua se obtiene de la siguiente expresión:

$$\% \text{ agua tisular} = \frac{\text{peso tejido fresco} - \text{peso tejido seco}}{\text{peso tejido fresco}} \times 100$$

Un método mucho mas exacto y rápido fue propuesto por Marmarou et al (1982) y se basa en la construcción de una columna de densidades crecientes en la que se depositan pequeñas muestras de tejido. Las piezas tienden a caer hacia el fondo, pero quedarán estabilizadas cuando lleguen a la capa de la columna donde la densidad del liquido sea la misma que la del tejido. Para preparar la columna se utilizan dos solventes orgánicos, el petróleo (d=0.757, es decir, menos denso que el agua) y el bromobenceno (d=1.497, es decir, mas denso que el agua). Tras la mezcla de volúmenes calculados de ambos productos se hacen dos soluciones de diferentes densidades y se dejan caer en una probeta en un flujo determinado para crear una columna de densidades crecientes. La calibración de la columna se hace dejando caer unas gotitas de soluciones de densidad conocida, que



quedan a una altura determinada del fondo de la probeta. Con unas 4-6 gotas se construye una recta de regresión, que cuando tiene un coeficiente de correlación alto ( $r > 0.995$ ) se considera válida. Posteriormente se depositan pequeñas porciones de tejido (1x1 mm) y se dejan caer durante 2 minutos, leyendo la medida de profundidad y calculando seguidamente en la recta de regresión el valor de la densidad. La columna preparada sigue siendo útil durante algunos días, aunque cuando se depositan varias piezas resulta difícil encontrar espacio para que las siguientes recorran su camino. En nuestra experiencia, la densidad del tejido cerebral normal depende de la zona estudiada, pero con un valor desde 1.0445 a 1.0450, mientras que en caso de edema isquémico por oclusión de la carótida aumenta el contenido de agua y la densidad baja a valores entre 1.0409 y 1.0417.

## REFERENCIAS

- Baskin DS, Hosobuchi Y, Grevel JC. Treatment of experimental stroke with opiate antagonists. Effects on neurological function, infarct size and survival. *J Neurosurg* 64: 99-103, 1986.
- Bederson JB, Fitts LH, Tsui M, Nishimura MC, Davis RL, Bartkowski H. Rat middle cerebral artery occlusion: evaluation of the model and development of a neurological evaluation. *Stroke* 17: 472-476, 1986.
- González-Darder JM, Weinstein PR, Gil-Salú JL. Experimental microsurgical repair of intracranial sinuses. *Res Surg* 1: 77-80, 1989.
- González-Darder JM, Cañadas-Rodríguez D. Effects of spinal cord stimulation in experimental ischaemic oedema. *Neurol Res* 13: 229-232, 1991.
- Greene EC. *Anatomy of the Rat*. Philadelphia. Hafner Publishing Co, 1963.
- Marinov M, Wassmann H, Natschev S. Effect of nimodipine in treatment of experimental focal cerebral ischaemia. *Neurol Res* 13: 77-83, 1991.
- Marmarou A, Tanaka K, Shulman K. An improved gravimetric measure of cerebral edema. *J Neurosurg* 56: 246-253, 1982.
- Rowett HGC. *Guías de Disección. III La rata*. Barcelona, Ediciones Urania, 1976.
- Waynforth HB. *Experimental and Surgical Techniques in the Rat*. London. Academic Press, 1980.





# 8

## TECNICA ESTEREOTACTICA

---

- I. Introducción
  - II. Atlas Estereotáticos
    - A. Sistema de Coordenadas. Cero Estereotático
    - B. Construcción de un Atlas
    - C. Representación del Encéfalo en los Atlas
    - D. Reconocimiento de Estructuras en los Diagramas
  - III. Aparato Estereotático
    - A. Descripción del Aparato Estereotático
    - B. Piezas de Fijación del Animal
    - C. Manipuladores y Micromanipuladores
    - D. Calibración del Aparato Estereotático
    - E. Colocación del Animal en el Aparato Estereotático
  - IV. Valoración de la Técnica Estereotática
-



## I. INTRODUCCION

Las técnicas estereotácticas permiten, mediante la utilización combinada de atlas específicos para cada animal experimental y de instrumentos de precisión, los aparatos estereotácticos, el acceso con precisión a las diferentes estructuras encefálicas, tales como los ventrículos, tractos nerviosos o núcleos neuronales. Estas estructuras encefálicas están cartografiadas y referidas a un sistema de coordenadas en los atlas estereotácticos, por lo que la interpretación de estos atlas va a permitirnos conocer la localización en el espacio de cada una de estas estructuras. Sin embargo, esto sólo ocurre cuando la cabeza del animal experimental está convenientemente orientada en el espacio, gracias a su fijación en un aparato estereotáctico, con el que podremos reproducir experimentalmente las coordenadas indicadas en el atlas y de este modo acceder a la estructura deseada. Existe una gran controversia acerca de la palabra que debe usarse para describir esta técnica y los aspectos relacionados con la misma. El término 'estereotáxico' procede de las raíces griegas 'tridimensional' y 'sistema', mientras que el término 'estereotáctico' combina la raíz griega 'tridimensional' y la palabra latina 'tacto'. Nosotros vamos a utilizar, como se hace en el ambiente neuroquirúrgico, la palabra 'estereotáctico', aun sabiendo de que en el campo experimental se prefiere el término de 'estereotaxia'.

La técnica estereotáctica fue introducida por Horsley y Clarke en 1908, para la experimentación animal, pasando a la clínica humana en 1947 cuando Spigel y Wicys desarrollan la técnica dotándola de la suficiente precisión como para ser utilizada como técnica quirúrgica.

En este capítulo vamos a describir, en primer lugar el fundamento en el diseño e interpretación de los atlas estereotácticos, así como la correcta utilización de los aparatos estereotácticos y sus posibles aplicaciones en trabajos de investigación. Para ello vamos a centrarnos en la descripción de atlas y aparatos estereotácticos diseñados para la experimentación animal, fundamentalmente los diseñados para su aplicación en ratas.



## II. ATLAS ESTEREOTACTICOS

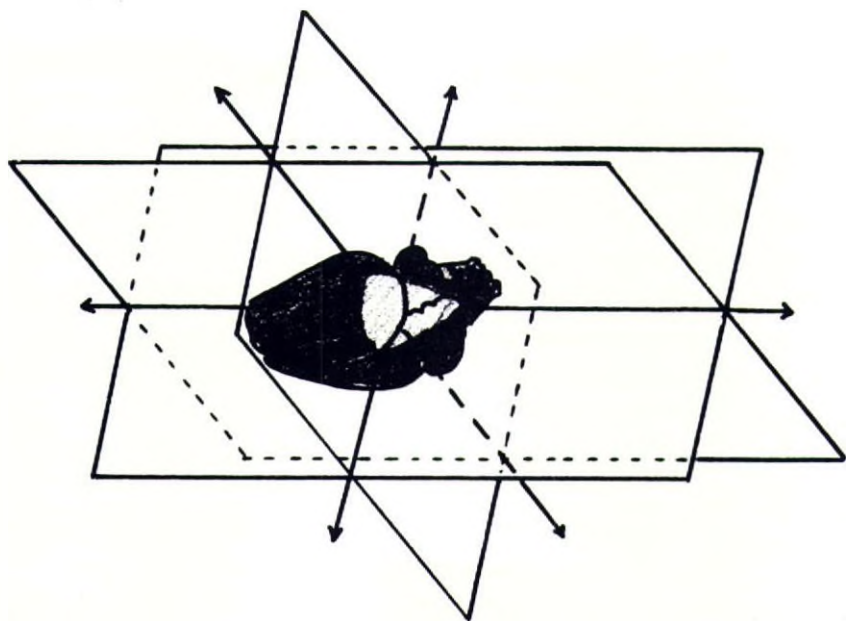
Los atlas estereotácticos van a contener una representación a escala del encéfalo, normalmente mediante diagramas realizados a partir de cortes histológicos (aunque en algunos casos son los propios cortes los representados en el atlas, o ambos). Lo que caracteriza al atlas estereotáctico es que estos diagramas se presentan referenciados a un sistema de coordenadas.

Los diagramas o cortes histológicos representados se corresponden con secciones de 40 a 150 micras cada 0,25 - 1 mm según los diferentes autores, a todo lo largo del encéfalo en planos coronales, sagitales u horizontales, siendo los planos coronales los más frecuentemente utilizados (Figura 8-1).

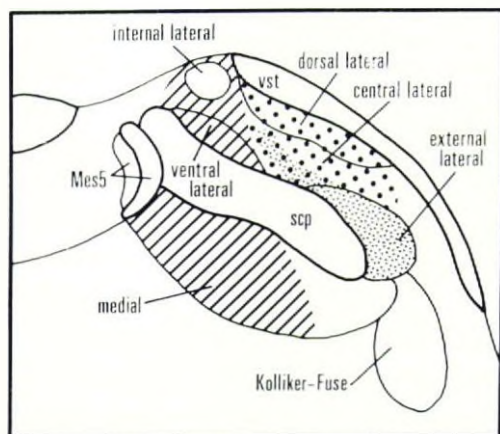
La representación de diagramas a partir de cortes histológicos del Sistema Nervioso Central, en los que se describen de manera exhaustiva la organización de las neuronas en diferentes centros o núcleos así como la trayectoria de sus axones y los haces nerviosos por los que discurren no es una actividad de reciente aparición, debiendo de mencionar en este punto la enorme y cada día más sorprendente obra de Ramón y Cajal que sigue siendo actualmente referencia obligada y punto de partida en todo trabajo de investigación en torno a la mayor parte de las estructuras del Sistema Nervioso Central. Los atlas estereotácticos utilizan secciones histológicas en las que, mediante técnicas generales de tinción, se hacen visibles al microscopio óptico todas o gran parte de los centros y estructuras del Sistema Nervioso Central, de modo que pueda reconocerse la localización anatómica de estas estructuras descritas previamente por neuroanatomistas o neurofisiólogos.

Los atlas estereotácticos constituyen de este modo una cartografía a escala del encéfalo referenciadas con respecto a un sistema de ejes cartesianos en las tres direcciones del espacio, de modo que pueda conocerse con la mayor exactitud posible la extensión y localización espacial de cada uno de esos centros del Sistema Nervioso Central.

La utilidad de los atlas estereotácticos es doble: por una parte ayudan al investigador a calcular con la máxima precisión los parámetros que debe introducir en un aparato estereotáctico para acceder a un determinado punto del encéfalo; por otro, facilitan el reconocimiento de las diferentes estructuras del mismo al hacer un estudio al microscopio óptico, convirtiéndolo en un instrumento indispensable en cualquier trabajo de investigación que implique la necesidad de reconocer sobre preparaciones histológicas la localización de estas estructuras. Sin embargo, el continuo aporte de nuevos datos anatomofisiológicos referentes a la organización de las estructuras encefálicas hace que los atlas editados no puedan recoger toda la información existente anterior y posterior a la publicación del atlas, sobre todo en lo referente a los subnúcleos y subestructuras en las que se pueden dividir numerosos centros en función de diferentes matices anatómicos o funcionales. Por ello en estudios específicos en torno a un determinado centro nervioso es conveniente ampliar la información recogida en estos atlas con datos recogidos en la bibliografía reciente y referidos a la organización del centro a estudiar (Figura 8-2). No



**Figura 8-1.-** Representación esquemática de los tres ejes y planos de referencia en la técnica estereotáctica.



**Figura 8-2.-** Esquema que muestra la subdivisión de un núcleo talámico en varios subnúcleos, como consecuencia de estudios neurofisiológicos y neuroanatómicos más específicos.



obstante, en numerosas ocasiones, tanto en trabajos de microlesión, microinyección o microestimulación así como en algunos trabajos de registro de actividad neuronal, la información recogida en los atlas estereotáticos puede ser suficiente, siempre y cuando se hagan las necesarias comprobaciones tras finalizar el trabajo respecto a la correcta ubicación de la inyección, lesión o registro correspondiente.

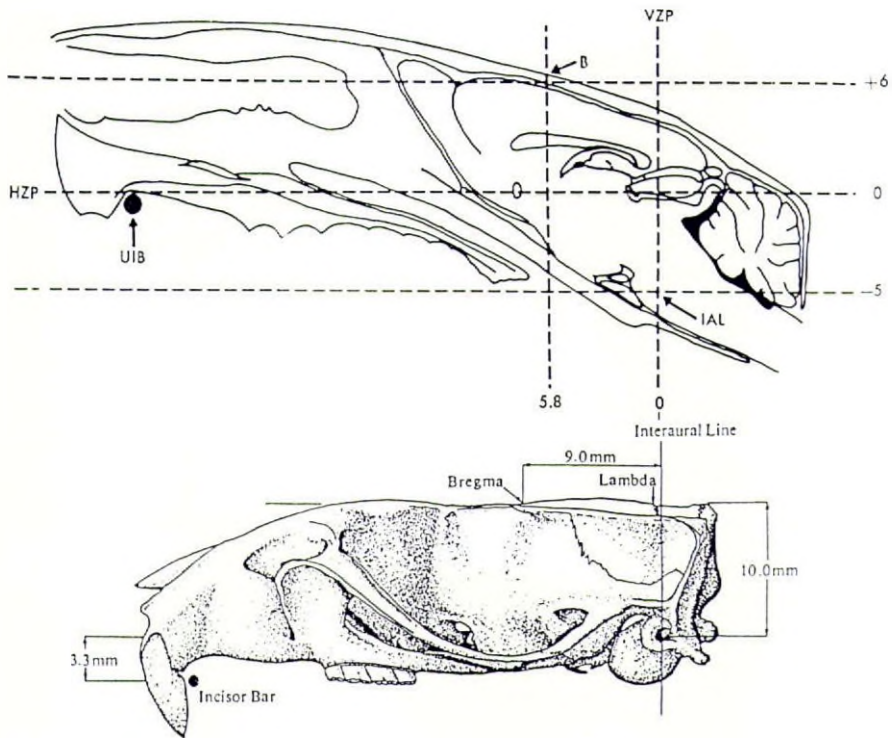
De entre los atlas estereotáticos más utilizados en los últimos años en experimentación animal debemos citar el elaborado por Berman (1968) para el tronco de encéfalo del gato, y los elaborados por Köning y Klippel (1963), Albé-Fessard (1971) y más recientemente por Pellegrino y Cushman (1979) y por Paxinos y Watson (1986) para el cerebro y la médula de rata. Es a estos dos últimos atlas a los que nos vamos a referir fundamentalmente, puesto que son con los que hemos trabajado habitualmente.

### **A. Sistema de coordenadas. Cero estereotático**

Como hemos expuesto en la introducción, los diferentes diagramas representados en cada uno de esos atlas van a estar referenciados a un sistema de coordenadas en los ejes dorsoventral, mediolateral y rostrocaudal. Estos tres ejes están referidos a un punto 0, o “cero estereotático”, el cual es preestablecido de antemano y puede encontrarse a partir de estructuras anatómicas de fácil localización y reconocimiento.

Existen varios puntos que pueden ser considerados en los atlas estereotáticos como puntos de referencias y con respecto a los cuales son establecidas las diferentes medidas y distancias en esas tres direcciones del espacio. Como referencia en el eje rostrocaudal (anteroposterior) se emplean los puntos del cráneo que se conocen como bregma (punto de unión de las suturas coronal y sagital) y lambda (punto medio del arco descrito por la sutura lambdaide, por detrás del punto de unión entre ésta y la sutura sagital). Sin embargo, cuando se habla de “cero estereotático”, los autores suelen referirse a un punto cero para los tres ejes y fundamentalmente al correspondiente al punto medio de la “línea interaural”, que sería una línea recta imaginaria que uniría los orificios auditivos externos atravesando la protuberancia ventral. Este eje coincide, como veremos, con el eje que delimitan las barras de fijación interauriculares de los aparatos estereotáticos. De este modo podremos conocer previamente a la colocación del animal, la localización espacial del “cero estereotático” del aparato y calibrar así los diferentes accesorios que van a ser utilizados para acceder a la zona del encéfalo a estudiar. Evidentemente, este cero estereotático va a ser el mismo para todos los atlas elaborados para aparatos con el sistema de fijación mediante barras interauriculares, pero las coordenadas de los diferentes puntos del encéfalo respecto al cero van a variar en función de la inclinación de la cabeza en el aparato. Curiosamente, esta inclinación varía según los diferentes autores. La inclinación se determina por la altura de la base de los incisivos respecto de la línea interaural (Figura 8-3).





**Figura 8-3.-** Esquema que muestra los diferentes ejes y planos de referencia de los atlas estereotácticos en relación al cráneo y cerebro de la ratona (ver texto).

## B. Construcción de un Atlas

Cuando se pretende elaborar un atlas estereotáctico, el procesamiento histológico de los cerebros que se utilicen debe ser tal que los cortes se lleven a cabo en el microtomo según los planos definidos por los diferentes ejes del sistema de coordenadas que hayamos diseñado. Para ello, una vez determinado el “cero estereotáctico” y dispuesto el animal experimental en el aparato estereotáctico se procede a la introducción de finas agujas equidistantes entre sí y paralelas a cada uno de los ejes del sistema de coordenadas, delimitándose de este modo los diferentes planos (coronal, sagital u horizontal) en los que quieran efectuarse las secciones. Los tractos de estas agujas servirán de guía para mantener la posición correcta del encéfalo cuando éste sea dispuesto en un microtomo para su corte en lonchas. Las secciones serán posteriormente teñidas configurándose a partir de ellas los diferentes diagramas del atlas.

### C. Representación del Encéfalo en los Atlas

Estos diagramas, en el caso de los planos coronales se representan enmarcados por dos escalas verticales (a modo de ejes de ordenadas) a izquierda y derecha, calibradas en milímetros y tomando como cero la superficie del cráneo, la superficie del encéfalo o bien el plano horizontal que pasa por la línea interaural. Estas escalas nos permiten la localización de cualquiera de las estructuras representadas en el sentido dorsoventral, o dicho de otro modo la 'profundidad' de la estructura correspondiente; de forma similar la 'lateralidad' se calcula mediante una escala horizontal (a modo de eje de abscisas) cuyo cero se corresponde con la línea media representándose la distancia en milímetros a derecha e izquierda de la misma. Además en cada diagrama se indica la distancia del plano representado con respecto al plano cero (normalmente se representan dos valores: uno de ellos sería la distancia con respecto al plano coronal que contiene a la línea interaural y el otro el correspondiente al plano que contiene el bregma). De modo similar son representados los cortes en el plano sagital y horizontal con la salvedad de que, evidentemente, los puntos de referencia no son los mismos que para los cortes coronales; así, en el primer caso las referencias de cada diagrama indicadas con respecto al plano cero se corresponden con aquel que contiene la línea media, mientras que en el segundo caso se refieren al plano horizontal que contiene la línea interaural o al plano horizontal que contiene los puntos bregma y lambda (plano que coincide con la superficie del cráneo). Las distancias indicadas en los ejes de ordenadas se corresponden en ambos casos con distancias en el plano anteroposterior respecto a la línea interaural o al bregma, mientras que en el eje de ordenadas las distancias en los planos sagitales están referidas a la superficie del cráneo y en las secciones horizontales son referidas a la línea media (Figura 8-4).

### D. Reconocimiento de Estructuras en los Diagramas

En cada uno de los diagramas presentados en un atlas estereotáctico vamos a encontrar todas las estructuras correspondientes a núcleos o formaciones neuronales delimitadas con línea discontinua, que de este modo pueden distinguirse de los tractos o haces de fibras nerviosas, las cuales se representan delimitadas con línea continua. Cada una de estas estructuras se designa por unas siglas (que pueden variar según los autores). El significado de cada una de estas siglas se indica en un índice por orden alfabético que acompaña al atlas. Un segundo índice complementario recoge la misma información, pero ordenando alfabéticamente los nombres completos de cada una de las estructuras representadas en el atlas, correlacionándolas con sus iniciales correspondientes y las páginas donde aparecen representadas cada una de ellas.

Es conveniente insistir en que estos diagramas están basados en la información obtenida a partir del tratamiento histológico de un determinado número de encéfalos. Esto



hace que puedan aparecer, en la práctica, pequeñas variaciones, del mismo modo que pueden cometerse errores de cálculo al utilizar individuos de diferente estirpe, sexo o peso, de los utilizados por el autor del atlas que estemos utilizando. En cualquier caso y aun tomando las máximas precauciones en la elección de los animales y en el cálculo de los diferentes parámetros, nunca puede asegurarse que se ha accedido a una determinada zona del encéfalo si, tras dejar una traza de referencia en el punto al que deseamos llegar (lesión, depósito de colorante), no se hace un estudio histológico en el que pueda comprobarse la correcta localización de la misma.

### **III. APARATO ESTEREOTACTICO**

La elaboración de atlas estereotácticos ha podido llevarse a cabo a partir del diseño de aparatos de precisión en los cuales puede disponerse la cabeza del animal experimental en una posición fija, carente de movilidad y fácilmente reproducible. La finalidad básica de estos instrumentos es posibilitar, con la ayuda de los atlas estereotácticos, el acceso a cualquier punto del encéfalo con la mayor precisión posible.

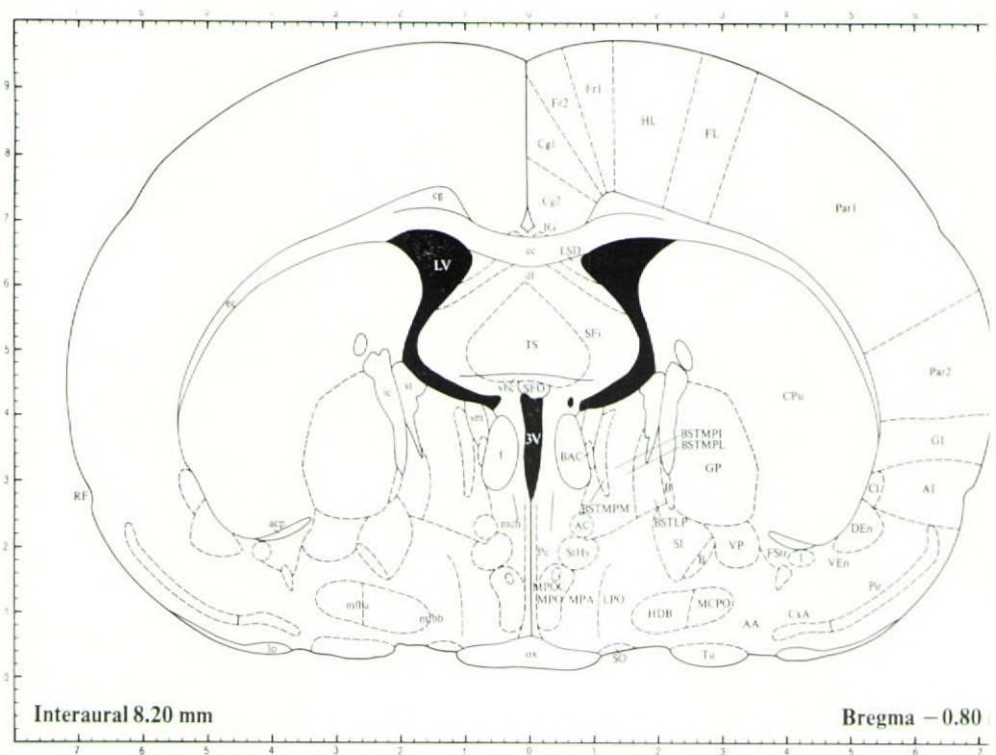
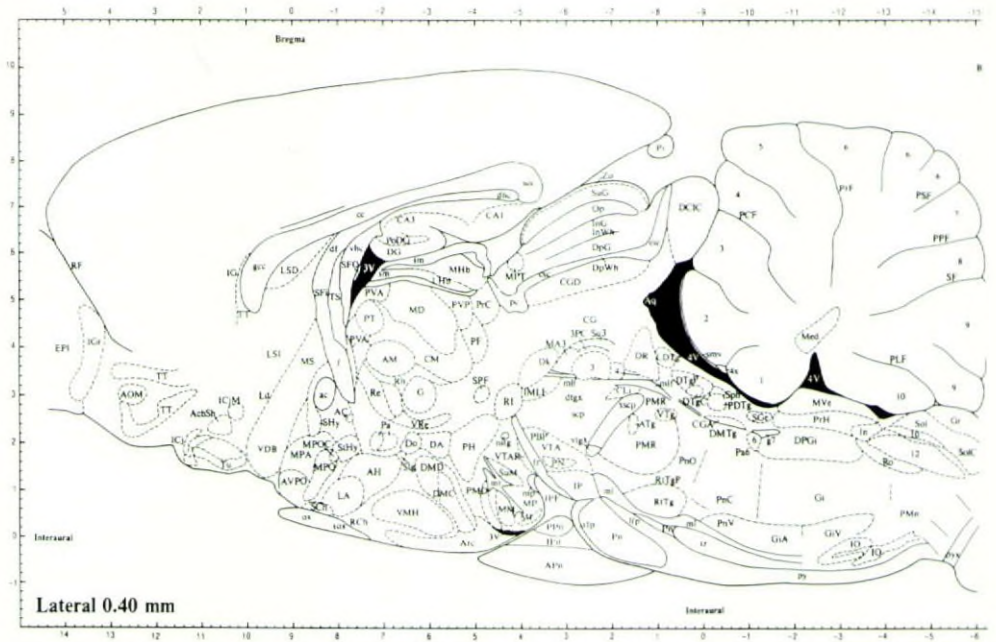
Existen diversos modelos de aparatos estereotácticos diseñados para la experimentación en pequeños animales (rata, hamster, cobaya, ratón, paloma), así como de mediano (gato, conejo) y gran tamaño (perro, mono). En el caso de los aparatos estereotácticos para la experimentación animal los más recomendables son los diseñados para trabajar con animales de mediano tamaño adaptables, por intercambio de las piezas de sujeción bucal y de las barras interaurales, para el trabajo con animales de pequeño tamaño como las ratas. En nuestro laboratorio utilizamos el aparato LPR (Paris, Francia) (Figura 8-5) y el David Koppf (Tujunga, Ca, USA) (Figura 8-6).

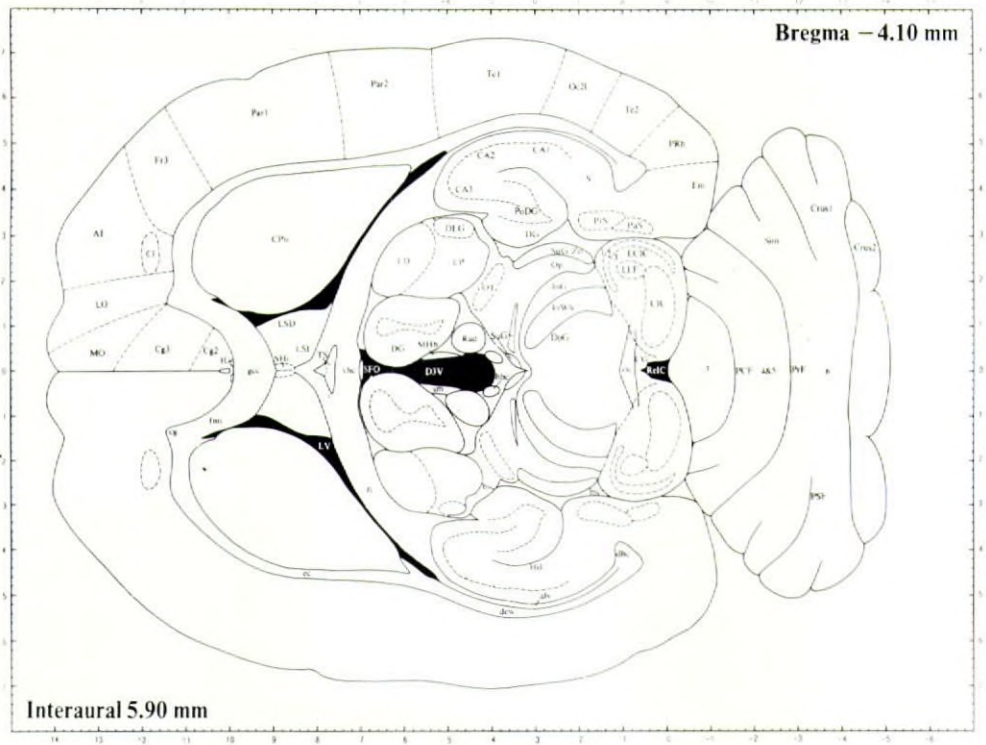
#### **A. Descripción del Aparato Estereotáctico**

Los modelos más generalizados constan de un cuerpo principal consistente en una pieza o bloque transversal sobre la que se fijan dos sólidas barras milimetradas y paralelas entre sí (llamémoslas barras principales) entre las cuales se dispondrá la cabeza del animal, fijada por la boca al bloque transversal mediante una pieza de sujeción, y por los orificios auditivos de los temporales a las barras principales mediante barras interauriculares milimetradas fijadas a aquellas (Figuras 8-5 y 8-6).

Es conveniente, sobre todo para el trabajo con animales de mediano o gran tamaño, que el aparato ofrezca la posibilidad de extender en longitud las barras principales mediante el acoplamiento a las mismas de barras adicionales, puesto que de este modo puede fijarse el animal en las apófisis espinosas de las vértebras mediante la utilización





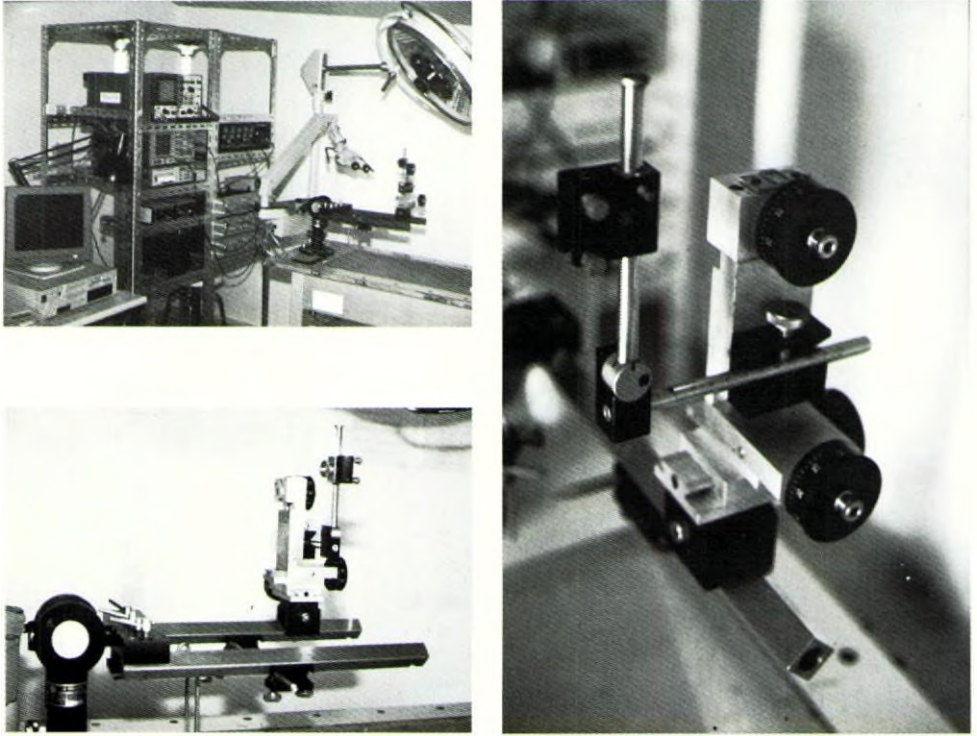


**Figura 8-4.-** Reproducción de los diagramas del atlas estereotáctico de Paxinos y Watson (1986), en los tres planos de referencia, para mostrar las medidas y coordenadas de las diferentes estructuras.

de pinzas especiales ('clamps') que se sujetan sobre estas barras adicionales. Esto permite utilizar el aparato para trabajar sobre la médula espinal puesto que con este sistema queda inmovilizada y en extensión.

En los aparatos estereotácticos convencionales, las barras principales van a servir además de soporte y de guía para la disposición de los micromanipuladores mediante los cuales podremos calcular las coordenadas adecuadas y efectuar el abordaje al punto del encéfalo deseado. Ultimamente se han diseñado aparatos estereotácticos simplificados en los que el bloque transversal y las barras principales constituyen una sola pieza de modo que estas últimas no son extensibles y están milimetradas sirviendo sólo como soporte para la sujeción de las barras interauriculares. En estos modelos suele incluirse un micromanipulador que se dispone fijo a otra barra accesoria lateral y paralela a una de las barras principales. Estos modelos están diseñados para el trabajo experimental en ratas y no pueden utilizarse para otro tipo de animales de experimentación, sobre todo si son de mayor tamaño, limitando sus aplicaciones a abordajes de precisión en el encéfalo, puesto que sus reducidas dimensiones no permiten la fijación espinal del animal ni el





*Figura 8-5.- Sistema estereotáctico La Precision Cinematographique. Se muestra una vista general del sistema montado sobre una mesa, e integrado en un equipo de estimulación y registro neurofisiológico y de microcirugía. En los detalles se aprecian los componentes del aparato y del sistema micrométrico acoplado al mismo.*

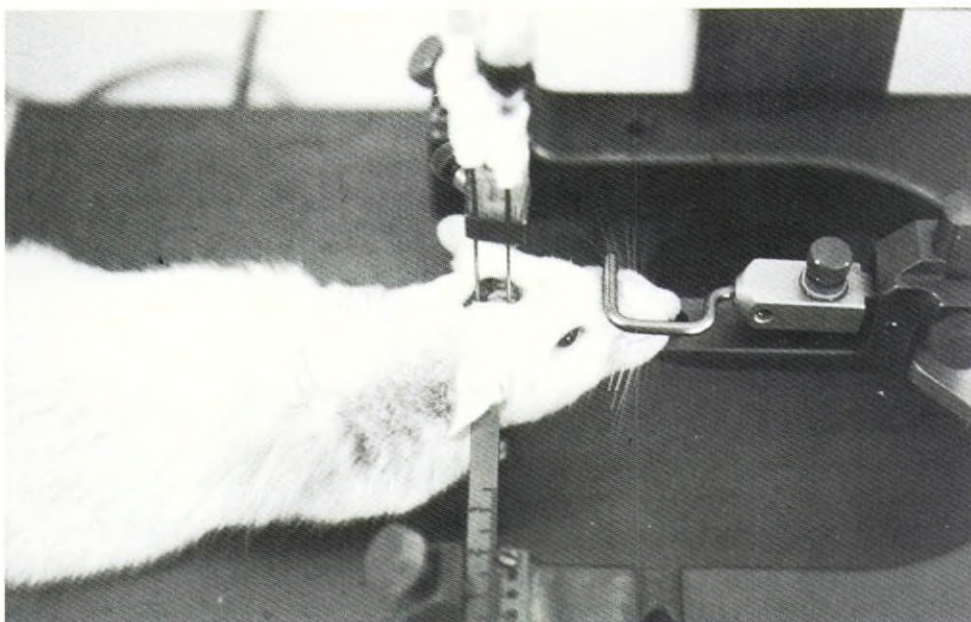
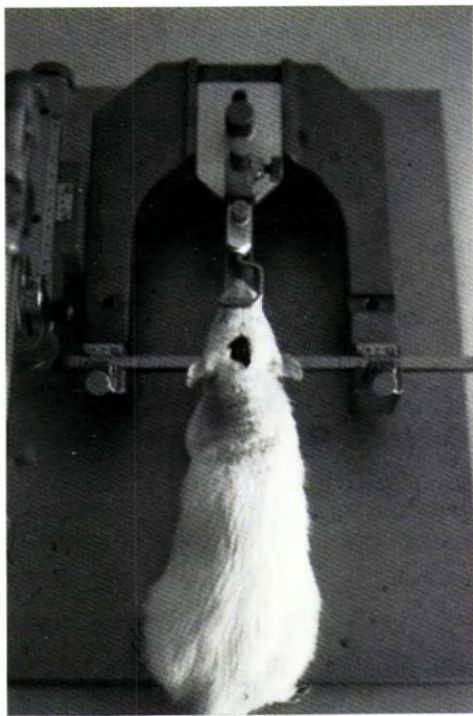
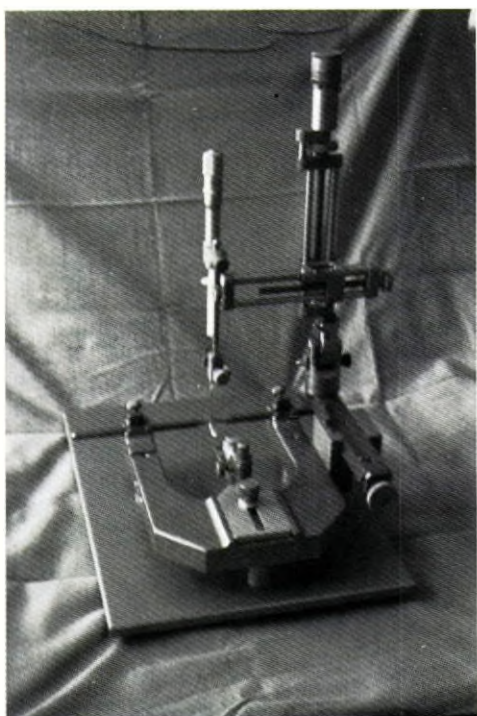
trabajo de precisión sobre la misma; tampoco facilita la posibilidad de utilizar un segundo micromanipulador o cualquier otro tipo de accesorio que en el caso de los modelos convencionales pueden disponerse simultáneamente sobre las barras principales.

### **B. Piezas de Fijación del Animal**

Como ya hemos adelantado en el apartado referente a los atlas estereotácticos, el cráneo del animal experimental queda sujeto al aparato estereotáctico por la boca, concretamente por el maxilar superior, mediante una pieza de fijación que se acopla con el bloque transversal, y por los orificios auditivos a través de barras interauriculares que se fijan a las barras principales.

Las barras interauriculares consisten en dos piezas de sección cuadrada o circular según los modelos, con uno de sus extremos en forma cónica y puntiaguda. Estas piezas





**Figura 8-6.-** Sistema estereotático Daviv Koppf. Se muestra una vista general del sistema, con sus barras, torres y manipulador. En las otras fotografías se muestra la rata sujeta con las barras auriculares y con la pinza para el hocico. Se muestra cómo dos agujas son introducidas en puntos concretos del cerebro, en este caso para producir una hemorragia intracerebral y recoger simultáneamente los cambios en la presión intracraneal.

se fijan a cada una de las barras principales quedando totalmente perpendiculares a las mismas, alojándose en sendas hendiduras dispuestas para este fin en estas barras y con el extremo afilado hacia el interior, de modo que estos extremos se introducen por los orificios auditivos del animal hasta alojarlos en el correspondiente conducto auditivo externo. En esta posición, el eje definido por las barras interauriculares debe coincidir con la línea interaural, de modo que en esta disposición, el único movimiento posible de la cabeza del animal experimental, antes de fijarla al bloque anterior, debe ser pivotante en torno a este eje (figura 8-6).

La pieza de sujeción de la boca, en el caso de la rata, se fija al bloque principal, pudiendo desplazarse normalmente en el sentido anteroposterior para adaptarse al tamaño del cráneo del animal al que sujeta mediante una pinza que oprime el hocico sobre la base de los incisivos superiores. Esta pieza debe poder desplazarse en altura permitiendo modificar la posición de la cabeza para adaptar la inclinación de la misma al atlas estereotáctico que estemos utilizando. La referencia utilizada en los mismos para determinar esta posición suele ser la altura de la base de los incisivos superiores con respecto a la línea interaural (Figura 8-6).

### **C. Manipuladores y Micromanipuladores**

Una vez fijado el animal en el aparato estereotáctico, el acceso al encéfalo del microelectrodo, micropipeta o cualquier otro tipo de sonda que queramos introducir en el mismo se lleva a cabo disponiendo esta sobre un manipulador. Los manipuladores se disponen sobre las barras principales pudiendo desplazarse en toda la longitud de las mismas. En el caso de los modelos de estereotácticos simplificados ya comentamos que los manipuladores no se disponen directamente sobre estas barras, sino en barras accesorias que incluyen la posibilidad de desplazamiento anteroposterior de los mismos en un eje paralelo a las barras principales. En cualquier caso los modelos más sencillos de manipuladores van a permitir la posibilidad de desplazamientos de nuestra sonda en los ejes anteroposterior, transversal y dorsomedial con una precisión de décimas de milímetro. Estos instrumentos están constituidos por tornillos milimétricos graduados de modo que esta graduación se correlaciona con una pequeña regleta dividida en diez unidades o nonio que se corresponderían con las décimas de milímetro (Figura 8-6).

En muchos casos, sobre todo en experimentos de registro de actividad unitaria de neuronas, se necesita desplazar el electrodo de registro centésimas de milímetros o incluso micras en el sentido dorsoventral (vertical) para poder aproximar con la suficiente precisión ese electrodo a la neurona. Para estos casos se hacen necesarios instrumentos de mayor precisión que permitan desplazamientos mínimos en el eje dorsoventral de al menos diez micras. Estos instrumentos reciben el nombre de micromanipuladores, existiendo modelos capaces de llevar a cabo desplazamientos del electrodo de una micra



(Figura 8-5). Si además pretendemos hacer registros intracelulares, en los cuales el electrodo debe introducirse en el interior de la neurona, el tornillo para el desplazamiento en este eje dorsomedial no puede accionarse manualmente puesto que en ese caso el extremo del electrodo empujaría a la neurona sin perforar su membrana, por ello es necesario utilizar micromanipuladores motorizados que permiten pequeños desplazamientos a gran velocidad ('steps') lo que facilita la perforación de la membrana neuronal sin desplazarla.

#### **D. Calibración del Aparato Estereotáctico**

En primer lugar, para poder trabajar con un máximo de garantías en cuanto a precisión se refiere, es fundamental comprobar el perfecto paralelismo de las barras principales, corrigiendo si es posible los errores que puedan producirse al respecto con el uso continuado del aparato. Suele recomendarse la comprobación anual en los casos de un uso frecuente.

Previamente a la colocación del animal experimental en el aparato debe determinarse las coordenadas del cero del aparato o interaural, que se correspondería con el punto medio del eje definido por las barras interaurales. Para ello se disponen esas barras en su emplazamiento habitual de modo que sus extremos se aproximen hasta tocarse en un punto que debe estar exactamente a la misma distancia de cada una de las barras principales, lo cual es fácilmente comprobable puesto que las barras interaurales están milimetradas. Este punto se corresponderá con el cero interaural en el encéfalo del animal.

Una vez hecho esto, disponemos la sonda que queramos introducir en el encéfalo del animal experimental sobre el manipulador y colocamos éste sobre una de las barras principales. Luego hacemos coincidir el extremo de la sonda con el punto definido previamente por los extremos de las barras interaurales. En esta posición anotamos cuidadosamente todos los parámetros indicados en el manipulador para cada una de los tres ejes anteroposterior, dorsoventral y lateral (transversal). Estas serán pues las coordenadas del cero interaural de manera que, si no se modifica la colocación de la sonda sobre el manipulador, al reproducir esas coordenadas durante el experimento, el extremo de la misma debe coincidir nuevamente con el cero interaural. Las coordenadas de cualquier otro punto podrán conocerse haciendo las correcciones correspondientes en los parámetros del manipulador sobre los parámetros del cero en función de las distancias de ese punto al mismo, distancias que podremos conocer consultando el atlas correspondiente.

En el caso del atlas de Paxinos y Watson para la rata la posición de la cabeza del animal es tal que la base de los incisivos se localiza a 3,3 mm por debajo de la línea interaural. En esta posición el punto lambda se localiza prácticamente en la vertical del cero interaural, lo que facilita en gran medida la calibración del estereotáctico y la comprobación de la correcta posición del animal puesto que las coordenadas anteroposterior



y lateral de ambos puntos de referencia ( $\lambda$  y cero interaural) son casi las mismas y por tanto con estas coordenadas el extremo de la sonda debe coincidir prácticamente con el punto  $\lambda$  (exactamente debe situarse a 0,3 mm por detrás del mismo, teniendo en cuenta que esta es la distancia en el eje rostrocaudal que separan  $\lambda$  y la línea interaural cuando la cabeza se encuentra en esa posición). Esto no ocurre, por el contrario en el atlas de Pellegrino y Cushman en los que la cabeza del animal queda inclinada hacia arriba al disponerse la base de los incisivos a 5 mm por encima de la línea interaural, de modo que en esta posición  $\lambda$  se sitúa a 1,4 mm por detrás de la línea interaural en el plano rostrocaudal.

### **E. Colocación del Animal en el Aparato Estereotáctico**

Una vez calibrado el aparato y anotadas las correspondientes coordenadas podemos proceder a la colocación de nuestro animal experimental.

En primer lugar es preciso sujetar la cabeza por medio de las barras interauriculares. Este proceso es más fácil de realizar entre dos personas de modo que cada una debe situarse a cada lado del aparato y sujetar el animal por una oreja quedando la cabeza entre las dos barras principales y en una posición centrada evitando que quede ladeada o inclinada. Sin soltar la cabeza del animal se procede a introducir delicadamente el extremo de cada barra interauricular por los correspondientes orificios auditivos de modo que cada barra queda orientada de arriba abajo, de detrás a delante y de fuera a dentro. Una vez en esta posición y haciendo pivotar la barra sobre su extremo sin presionar excesivamente y procurando no mover la cabeza, disponemos las barras en su alojamiento correspondiente en cada barra principal. Una vez dispuestas las barras interauriculares en sus emplazamientos debe comprobarse que la cabeza no puede moverse en ningún sentido a no ser pivotando sobre la línea interaural, en caso contrario debe repetirse la operación hasta tener la seguridad de que el cráneo se encuentra en la posición correcta. La fijación interaural se completa centrando la cabeza de modo que los extremos de las barras interaurales se encuentren a la misma distancia de las barras principales. Por último se procede a la fijación de la boca del animal no sin antes comprobar que la altura de la correspondiente pieza de fijación es la adecuada para que el cráneo quede en la posición utilizada por el autor del atlas estereotáctico que estamos empleando.

Este procedimiento puede ser llevado a cabo por una sola persona, sobre todo cuando esta ha adquirido una cierta destreza en el manejo del aparato estereotáctico. Para ello, debe fijarse en primer lugar una de las barras interaurales, emplazando la otra en su alojamiento pero sin fijarla excesivamente de forma que pueda desplazarse. Una vez hecho esto y sujetando delicadamente la cabeza del animal hacemos pasar el extremo de la barra fija por el orificio auditivo del lado correspondiente y posteriormente, llevando la cabeza a la posición definitiva desplazamos la otra barra introduciéndola en el otro

orificio y fijándola finalmente. Por último se debe proceder a la comprobación de la correcta fijación y al centrado de la cabeza.

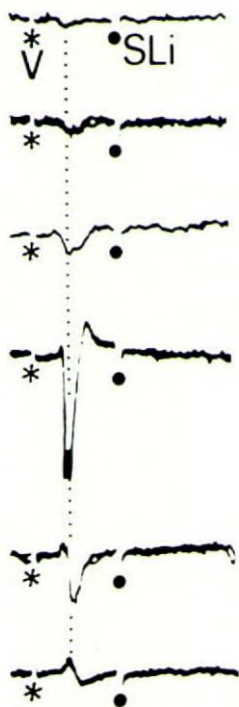
Si bien la fijación de la boca no implica ninguna dificultad, la colocación de las barras interaurales, por el contrario, suele dar problemas cuando el/los usuarios no poseen la práctica suficiente, siendo muy frecuente en estos casos que, por una mala disposición de las barras al introducirlas en los orificios auditivos o al moverlas para fijarlas a las barras principales, el extremo de las mismas apoye sobre la membrana timpánica rompiéndola, lo que puede ocasionar una hemorragia a nivel del oído medio.

### **III. VALORACION DE LA TECNICA ESTEREOTACTICA**

Como ya se ha comentado al principio del capítulo, los sistemas estereotácticos permiten gran precisión en la aproximación a determinados centros del encéfalo, siempre y cuando se respete todo lo comentado en cuanto a características de los animales utilizados y a la posición del animal, ya que estos deben coincidir con las características y la posición elegidas por los autores del atlas a utilizar. Pero aun así atlas y aparatos estereotácticos no dejan de ser un instrumento de aproximación que no nos permite asegurar sin otro tipo de comprobación el haber tenido éxito y el haber accedido al punto del encéfalo al que pretendíamos llegar. Es pues necesario completar el estudio con una comprobación adicional.

En el caso de experiencias de electrofisiología en las que se hace la introducción estereotáctica de un electrodo, esta comprobación podrá consistir en la constatación de que la actividad del centro en la que hemos situado el extremo del electrodo presenta la actividad y las respuestas esperadas del centro que pretendíamos registrar. Así, por ejemplo, si se desea llevar a cabo un registro en una población de motoneuronas tras llevar a cabo la aproximación estereotáctica a las mismas en función de los parámetros obtenidos a partir de un atlas estereotáctico, podemos confirmar que hemos situado el electrodo en la población correspondiente si estimulando eléctricamente el consiguiente nervio motor a nivel periférico (que contendría los axones de estas neuronas), recogemos una respuesta eléctrica a nivel de nuestro electrodo (lo que en electrofisiología se denomina activación o estimulación antidrómica) (Figura 8-7). Al finalizar la correspondiente experimentación podremos comprobar histológicamente la localización de ese electrodo detectando la marca que dejó en el tejido. De forma similar puede comprobarse también la localización de microlesiones o microinyecciones, siendo indispensable para la validación de los resultados obtenidos que las mismas se hallen en el punto donde queríamos encontrarlos (figura 8-8).





*Figura 8-7.-Potenciales de campo registrados en el nucleo ambiguo de la rata en respuesta a la estimulación del nervio laríngeo ipsilateral. Se aprecia cómo conforme se profundiza con el electrodo la respuesta es mayor, para reducirse cuando hemos profundizado demasiado.*



*Figura 8-8.-Corte del cerebro de una rata con una lesión electrolítica a nivel del septum izquierdo. Esta lesión se realizó como comprobación de un abordaje estereotáctico.*

## REFERENCIAS

- Albé-Fessard D, Stutinsky F, Libouban S. *Atlas Stéréotaxique du Diencephale du Rat Blanche*. Paris, CNRS. 1971
- González-Darder JM, Durán-Cabral J. Experimental intracerebral haemorrhage in normotensive and hypertensive rats. *Acta Neurochirur (Wien)* 107: 102-107, 1990
- Horsley V, Clarke RH. The structure and functions of the cerebellum examined by a new method. *Brain*, 31: 45-124, 1908.
- Köning JFR, Klippel RA. *The Rat Brain. Stereotaxic Atlas*. Baltimore, Williams & Wilkins. 1963.
- Moore RY. Methods for selective restricted lesion placement in the Central Nervous System. En Heimer L, RoBars MJ (eds): *Neuroanatomical Tract-Tracing Methods*. New York-London, Plenum Press. 1981, pp 55-90.
- Paxinos G, Watson C. *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates (2ª ed)*. San Diego, Academic Press. 1986
- Pellegrino LJ, Pellegrino AS, Cushman AJ. *A Stereotaxic Atlas of the Rat Brain*. New York, Plenum Press. 1979
- Spigel EA, Wycis HT, Marks M, Lee A. Stereotaxis apparatus for operations on the human brain. *Science*, 106: 349-350, 1947.





# 9

## TECNICAS CON MEDULA SUPRARRENAL

---

- I. Introducción
  - II. Anatomía Microquirúrgica e Histología
  - III. Abordaje a la Glándula Suprarrenal
    - A. Disección y Transplante de la Médula Suprarrenal
  - IV. Valoración de las Técnicas
    - A. Estudios Funcionales
    - B. Estudios Morfológicos
-





## I. INTRODUCCION

La glándula suprarrenal de los mamíferos tiene un doble origen embriológico ya que mientras la corteza es un derivado mesodérmico, la médula tiene un origen neuroectodérmico semejante al de las células ganglionares simpáticas. Las células emigradas de la cresta neural comienzan su diferenciación en dos líneas celulares, de forma que en la médula se encuentran células cromafines o feocromocitos junto a neuronas ganglionares.

El interés neuroquirúrgico actual de la médula suprarrenal reside en que las células medulosuprarrenales son una potencial fuente de neurotransmisores y de líneas celulares neuroepiteliales, por lo que podrían ser usadas para reparar determinados defectos metabólicos o estructurales causantes de enfermedades o síntomas neurológicos. Así, la enfermedad de Parkinson se debe a la degeneración del sistema dopaminérgico nigroestriatal y se ha intentado su tratamiento con el implante de material medulosuprarrenal a nivel intracerebral. Los primeros estudios experimentales se siguieron pronto con ensayos clínicos, como los de los grupos sueco (Backlund et al, 1985) y mejicano (Madrazo et al, 1987), que dieron partida a una fiebre de implantes por todo el mundo, en la actualidad en fase de revisión crítica. Otro aspecto de interés neuroquirúrgico de la médula suprarrenal fue sugerido por Sagen y Pappas (1987), cuando plantearon la posibilidad de usar el potencial efecto analgésico de las catecolaminas y neuropéptidos secretados por las células cromafines, transplantando al espacio subaracnoideo lumbar fragmentos de médula suprarrenal. Esta técnica ha sido usada en la clínica humana por Vaquero et al (1987) en un estudio piloto sobre dos pacientes.

## II. ANATOMIA MICROQUIRURGICA E HISTOLOGIA

Las glándulas suprarrenales de la rata adulta son dos pequeños órganos de color rosado pardusco localizados en la inmediata vecindad del polo superior de ambos riñones. Su topografía es retroperitoneal y se hallan rodeadas de la grasa perirrenal, estando separadas del polo renal por una capa de tejido que permite su deslizamiento y separación sin necesidad de manipular el riñón correspondiente. Poseen un pedículo vascular con las

arterias y venas suprarrenales y un importante aporte nervioso. Las neuronas de las fibras que llegan a la suprarrenal se hallan en las astas intermediolaterales de la médula espinal ipsilateral, en la rata localizadas entre los segmentos T1 a L2, aunque la mayor concentración se encuentra entre T7 y T12, sobre todo en el mielómero T9. Desde estas neuronas parten fibras, un gran número de ellas amielínicas, que circulan por la cadena simpática y llegan a la glándula por los nervios espláncnicos. Las fibras se distribuyen entrando en la médula donde hacen sinapsis en el polo apical de las células cromafines y con las células ganglionares. El principal mediador de esta inervación es la acetilcolina, aunque se considera que puede coexistir con otros mediadores como, entre otros, las encefalinas.

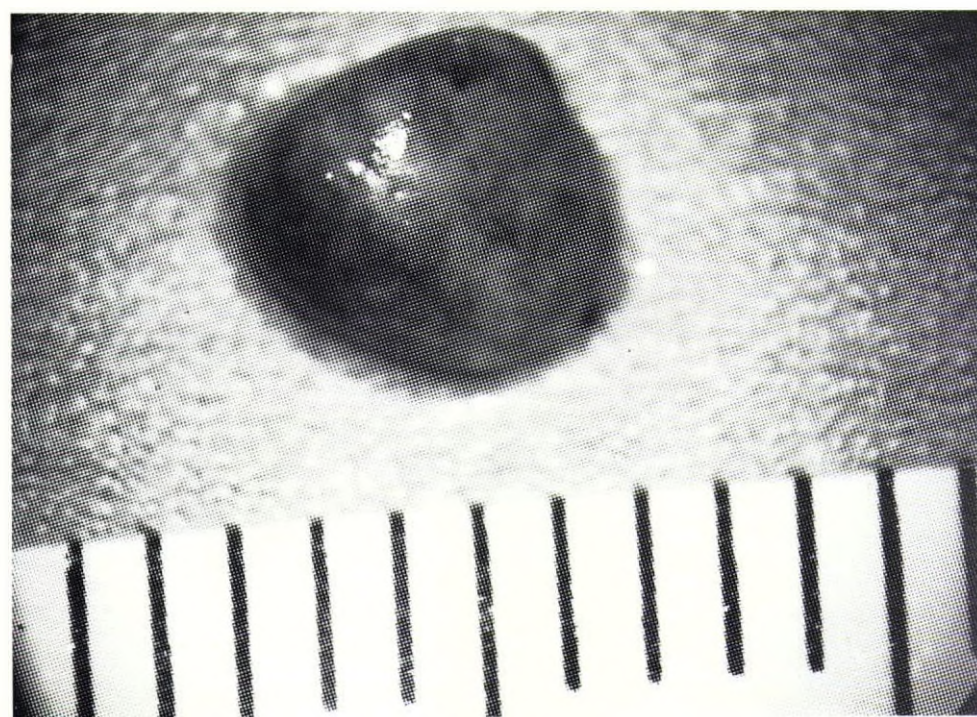
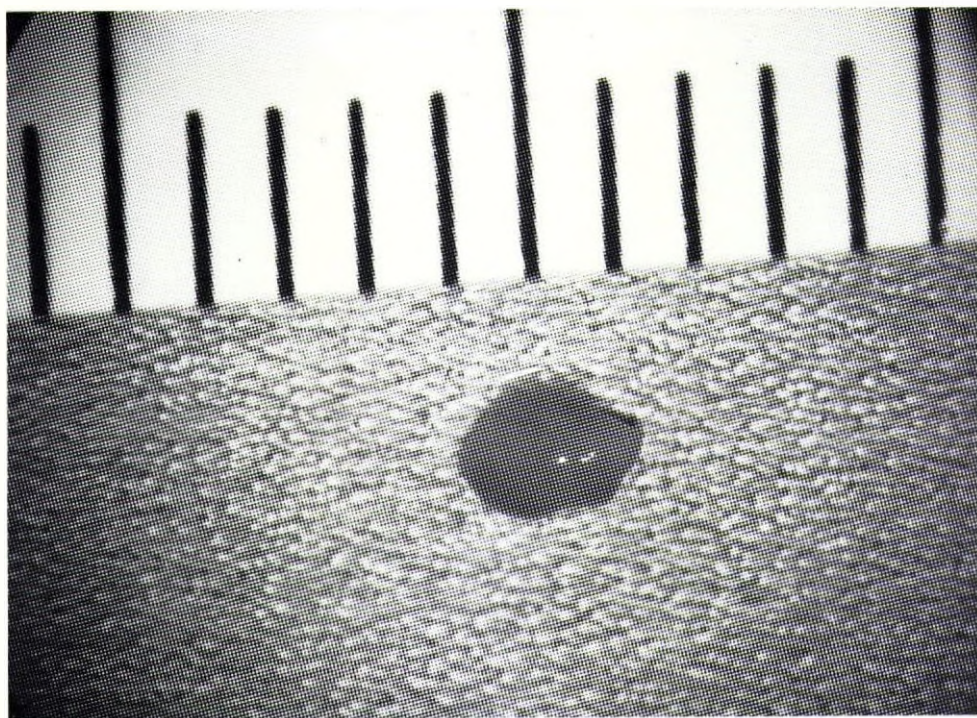
Cuando se estudia con el microscopio quirúrgico la glándula aislada se pueden identificar sus tres partes básicas. La cápsula es una fina capa fibrosa que se deja separar con facilidad. La corteza está formada por columnas celulares que se separan en bloques. Una vez reseca la corteza, queda en la porción más central una parte ovalada de color gris que corresponde a la médula (Figura 9-1).

Las células cromafines se disponen en cordones alrededor de los capilares, donde se apoya su polo basal o secretor, mientras que por su polo proximal reciben la sinapsis simpática (Figura 9-2). Estas células están llenas de gránulos de secreción, siendo clásico distinguir células con gránulos de noradrenalina (ovalados o redondos y con un núcleo central denso en la microscopía electrónica) y de adrenalina (redondos y con contenido pálido rodeado de un halo más claro) (Figura 9-2). Sin embargo, las células cromafines no contienen sólo estos neurotransmisores, sino que además existen otros clásicos como la dopamina (metabolito intermedio en la cadena de síntesis catecolaminérgica y que se halla tanto en las células adrenérgicas como en las noradrenérgicas), serotonina (en células adrenérgicas) e histamina (en células noradrenérgicas). También se han hallado numerosos neuropéptidos, de los que sólo vamos a destacar las encefalinas.

La localización y características de las encefalinas dependen de la especie animal y situación de la glándula. En la rata se ha encontrado met-enkefalina en las células cromafines y en las terminaciones presinápticas. La met-enkefalina parece que estaría almacenada y se liberaría conjuntamente con la noradrenalina, aunque no hay datos seguros al respecto. Cuando la médula es denervada por la sección de los espláncnicos o en situaciones más extremas, como el trasplante de la misma o en cultivo de tejido de células cromafines, se producen una serie de cambios metabólicos de interés. En este sentido, hay un incremento en el contenido de encefalinas en las células cromafines, que alcanza el 50-60% a los pocos días, mientras que las encefalinas de localización presinápticas se agotan rápidamente. El aumento de material encefalinérgico observado se debería a que la denervación espláncnica produciría una activación masiva de la producción de los precursores encefalinérgicos por vía transináptica.

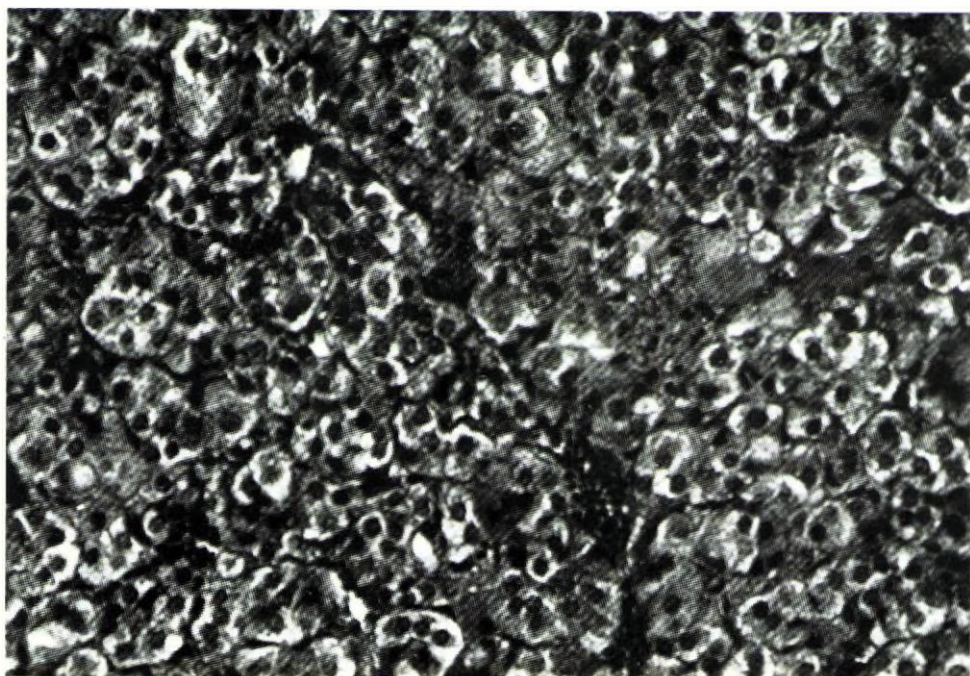
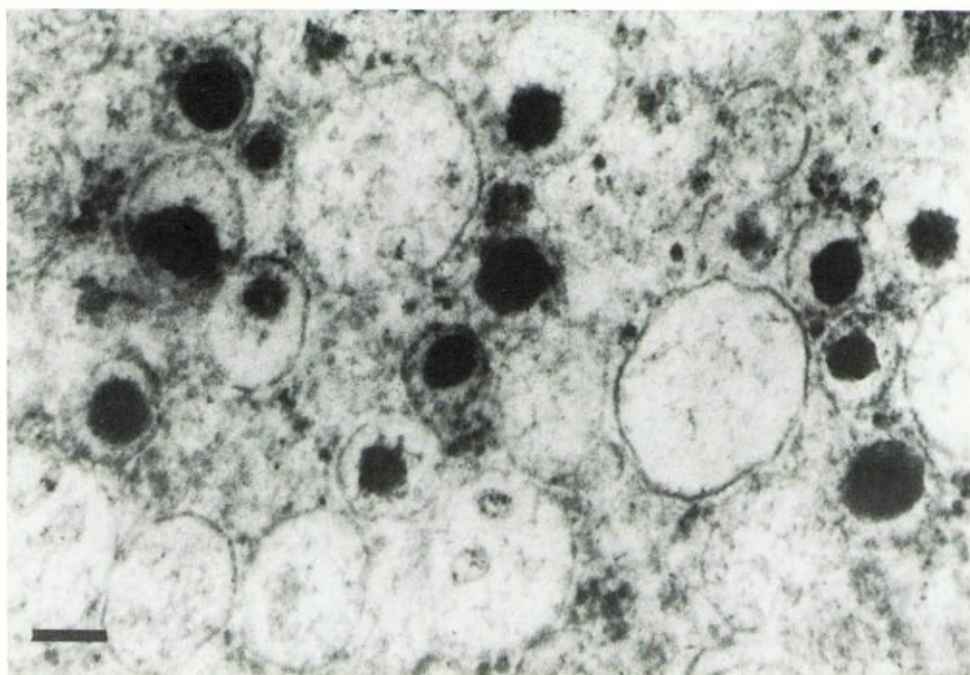
Por su parte, el aislamiento de la médula de la corteza produce un cambio en el producto final de la cadena de síntesis catecolaminérgica, de forma que pasa a ser predominantemente la noradrenalina en vez de la adrenalina. Esto se debe a que el





*Figura 9-1.- Aspecto macroscópico de la glándula suprarrenal de la rata después de retirar la cápsula (arriba). Aspecto macroscópico de la médula suprarrenal, una vez liberada de la corteza (abajo).*





*Figura 9-2.- Microfotografía de la médula suprarrenal de la rata, en la que se aprecia la disposición de las células cromafines en cordones, con abundantes capilares (H&E, x200). Estudio con microscopía electrónica de transmisión de una célula cromafín, mostrando abundantes gránulos de secreción con núcleo denso, es decir, del tipo noradrenérgico (barra 100 nm).*



responsable del paso de noradrenalina a adrenalina es la fenil-etanol-amin-N-metil transferasa, enzima que se activa por los corticoides producidos localmente en la propia corteza. La actividad de esta enzima se ve consiguientemente reducida cuando se impide la acción activadora de los corticoides de la corteza.

Cuando se cultivan células cromafines y se añade factor de crecimiento nervioso, las células cambian su fenotipo y en unos días comienzan a emitir prolongaciones de tipo neurítico.

Finalmente, es de interés que la secreción por parte de la médula de catecolaminas y encefalinas puede activarse con la estimulación del esplácnico o, farmacológicamente, con la administración de nicotina. En la rata una dosis subcutánea de 0.1 mg/kg de nicotina es suficiente.

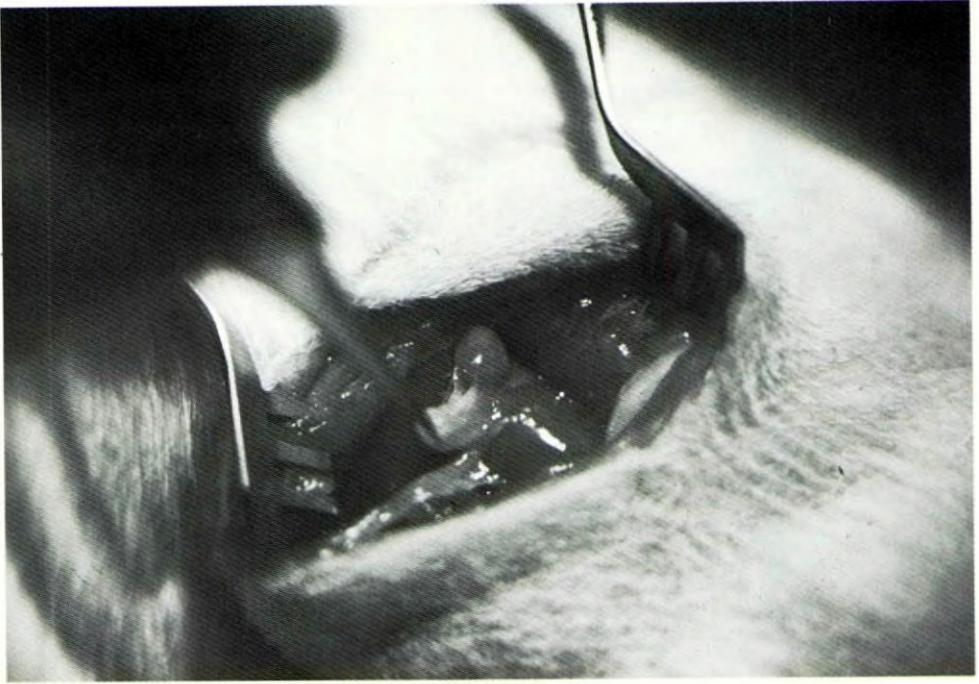
Así pues, la médula suprarrenal aislada y transplantada tiene una situación metabólica especial, caracterizada porque el producto final de la síntesis catecolaminérgica es predominantemente la noradrenalina, que aumenta el contenido de encefalinas y que la secreción de ambos productos puede ser activada por la nicotina. También las células aisladas de los mecanismos represores locales pueden alterar sus características fenotípicas emitiendo prolongaciones de tipo dendrítico para establecer conexiones con el tejido nervioso vecino.

### III. ABORDAJE A LA GLANDULA SUPRARRENAL

El abordaje a la glándula suprarrenal se hace para su extirpación con la finalidad de obtener la médula para su posterior trasplante. En este sentido, sobre todo cuando se pretende la supervivencia del animal en el caso de autotransplante, es recomendable abordar la glándula izquierda, ya que la derecha está en mas íntima relación con los lóbulos hepáticos que pueden ser lesionados inadvertidamente provocando una profusa hemorragia.

Una vez anestesiada la rata se rasura la zona dorsolumbar y se coloca en decúbito prono. Se reconoce la línea media palpando las apófisis espinosas y luego el reborde inferior de la última costilla, realizando una incisión longitudinal de unos 3 cm parasagital izquierda, a un centímetro de la línea media. Disecado el espacio subcutáneo se identifica la aponeurosis lumbar que rodea a la musculatura paravertebral, practicando una incisión vertical de unos 2 cm en la unión de musculatura paravertebral con la abdominal, por donde se ven emerger unos pequeños filetes nerviosos. Se entra entonces en el espacio retroperitoneal, con un abundante contenido en tejido graso y que tiende a extruirse a través de la incisión muscular. En el seno de este tejido se halla inmersa la glándula, que se encuentra tirando suavemente de dicha grasa, hasta ponerla en evidencia. Se toma entonces con una pinza el pedículo y se secciona (Figura 9-3). Generalmente no hay





*Figura 9-3.- Abordaje quirúrgico a la glándula suprarrenal. El abordaje retroperitoneal paravertebral se muestra en la fotografía de arriba, observándose como la glándula está inmersa en la grasa perirrenal (abajo).*

pérdidas hemáticas y no es necesario utilizar coagulación bipolar. La herida se cierra cuidando reparar bien el plano muscular, para evitar la hernia del tejido adiposo retroperitoneal. La extirpación de la glándula derecha se hace de forma semejante, pero los lóbulos hepáticos suelen interferir en la maniobra de identificación de la glándula. El abordaje por vía anterior, a través de una laparotomía, es mucho más laborioso y traumático (Figura 9-4).

### **A. Disección y Transplante de la Médula Suprarrenal**

Extirpada la glándula suprarrenal se traslada inmediatamente a una placa de Petri llena de una solución fisiológica burbujeada continuamente con una mezcla de 95% de  $O_2$  y 5% de  $CO_2$ . La solución preferible es la de Krebs modificada, que tiene la siguiente composición milimolar:  $ClNa$  120 mM,  $CO_3HNA$  27 mM,  $ClK$  4.5 mM,  $Cl_2Ca$  2.5 mM,  $PO_4H_2K$  1mM,  $SO_4Mg$  1 mM, dextrosa 10 mM, EDTA 0.04 mM y ácido ascórbico 0.1 mM. También puede usarse una solución de Ringer lactato. Para obtener la médula suprarrenal se coloca la placa con la glándula bajo el microscopio quirúrgico y manejando dos pinzas de relojero se desprende inicialmente la cápsula con todo el tejido graso que la acompaña. Luego se desprenden las columnas de corteza presionando suavemente con las puntas de la pinza hasta identificar un plano de clivaje que corresponde a la médula. Finalmente, la médula se libera de todo resto de corteza manipulándola cuidadosamente. La médula tiene una forma ovoide y su tamaño es de aproximadamente  $1 \times 1.5$  mm y se traslada a un recipiente con solución limpia, desde donde se procesa de la forma que se desee de acuerdo a la experiencia proyectada.

Para su implante intracraneal se precisa el empleo de la técnica estereotáctica, tratada en otro capítulo. La médula se divide en múltiples fragmentos que se colocan sobre una placa con una pequeña cantidad de solución fisiológica. Luego se aspira con una aguja delgada (n.20-22G) una pequeña cantidad de la solución (unos 10-20  $\mu l$ ) que contiene varios fragmentos de tejido. La aguja se monta en el aparato estereotáctico y se lleva al punto deseado, donde se arrastra el material introduciendo un fiador por la luz de la misma. En el caso de transplante al espacio subaracnoideo lumbar se realiza una laminectomía en el nivel deseado, abriendo la duramadre con la punta de una aguja en sentido longitudinal y paramedialmente. La médula puede implantarse entera o fragmentada varias porciones. Los implantes se deslizan entre las raíces de la cola de caballo, y la duramadre puede dejarse abierta o ser cerrada con unos puntos sueltos de hilo de 10/0. Fragmentos de médula pueden ser implantados en la propia médula espinal, siendo necesario para ello realizar una pequeña mielotomía longitudinal, donde se entierran los fragmentos. En este caso es necesario cerrar la duramadre para contener el injerto en el interior de la médula y evitar que sean extruidos.





*Figura 9-4.- Abordaje quirúrgico a la glándula suprarrenal a través de una laparotomía, donde se evidencian las relaciones de la glándula con el polo renal superior.*

#### **IV. VALORACION DE LAS TECNICAS**

Cuando se realiza el transplante de un tejido en el sistema nervioso hay una serie de cuestiones básicas de complejidad creciente que deben ser resueltas con las técnicas experimentales. Lo primero es saber si las células o el tejido transplantado sobreviven y, si lo hacen, en qué grado. En segundo lugar, conocer si las células que sobreviven mantienen las mismas características morfológicas y funcionales que las del tejido dador y, en caso de producirse modificaciones fenotípicas y citoarquitectónicas, conocer de qué tipo son. Finalmente, importa conocer si el transplante ofrece el resultado funcional deseado, recuperando o modificando los problemas neurológicos por los que se realizó. Para ello hay una serie de métodos morfológicos y funcionales que pueden ser aplicados a la hora de diseñar una experiencia en este sentido.

##### **A. Estudios Funcionales**

Desde un punto de vista funcional el control de los implantes intracerebrales de médula suprarrenal se hace estudiando dos modelos básicos de parkinsonismo. El modelo

mas usado inicialmente era el inducido en la rata por la **inyección estereotáctica intranigral de 6-OH dopamina** (6-OHDA). La inyección intranigral de 6-OHDA produce en la rata la lesión de la sustancia negra, que se traduce desde el punto de vista del comportamiento en una respuesta rotatoria del animal, quedando además el sistema estriatal hipersensible. Cuando la inyección es unilateral se producen los siguientes cambios: comportamiento motor caracterizado por marcha espontánea en sentido circular hacia el lado de la lesión, con incremento de la misma cuando se administran drogas favorecedoras de liberación de dopamina (anfetamina) y cambios del sentido de la rotación al administrar drogas con actividad dopaminérgica (apomorfina) y falta de atención hacia los estímulos sensoriales aplicados en el lado contralateral de la lesión. Cuando la lesión es bilateral la situación del animal es lamentable, con desarrollo de un comportamiento aquinético, inatención sensorial bilateral, cataplegia, afagia y adipsia. El modelo mas usado es el de lesión unilateral y activación con apomorfina, contando en un tiempo dado (60 minutos) el número de giros que dan, gracias a un rotómetro acoplado a la rata o mediante contaje manual. El implante de tejido de médula suprarrenal produce una reducción de las rotaciones inducidas por la apomorfina y la mejoría de la inatención, sobre todo cuando se asocia al implante factor de crecimiento nervioso. Más semejante a la realidad es el modelo de parkinsonismo que se consigue mediante la **administración intracarotídea en el mono de 1 metil-4 fenil-1,2,3,6 tetrahidropirina** (MPTP), producto altamente tóxico para las neuronas dopaminérgicas, especialmente de las de la sustancia negra, y que desarrolla un cuadro que se asemeja mucho a la enfermedad de Parkinson, no solo desde el punto de vista clínico (bradiquinesia, rigidez, temblor postural, inatención), sino también bioquímico e histológico.

En la valoración funcional del trasplante intraespinal de médula para el tratamiento del dolor se usan los modelos habituales de dolor agudo y crónico. En este sentido, el protocolo debe reunir modelos representativos de los diferentes tipos fisiopatológicos de dolor. El modelo de dolor agudo mas empleado es el estudio de la latencia de la retirada de la cola de la rata ante un estímulo doloroso (**test del "tail-flick"**). Para ello se coloca la cola del animal debajo de un foco radiante de luz infrarroja que la calienta, de forma que cuando el animal siente dolor la retira. El aparato (Tail Flick Unit, Ugo Basile, Italia) va provisto de una célula fotoeléctrica que cierra el circuito en ese momento y marca el tiempo de latencia. La prueba se hace en tres zonas diferentes de la cola y se considera como tiempo de latencia la media de las tres medidas. Se trata de un test que cuantifica un reflejo espinal de retirada nociceptiva. Como modelo crónico de dolor somatógeno se emplea la **rata artrítica**, que se consigue mediante la inyección intradérmica en la cola de la rata de *Mycobacterium butiryicum*, lo que desencadena a los pocos días una poliartritis inflamatoria generalizada, mas intensa en las patas posteriores. La intensidad del dolor se valora estudiando la actitud del animal en relación a su actividad motora y apoyo, medida del diámetro de las articulaciones tibiotarsales y, de forma mas objetiva, mediante el test de presión sobre la articulación mediante un aparato especialmente diseñado para ello (Paw



Pinch Unit, Ugo Basile, Italia). Como modelos de dolor crónico por deafferentación destacan la **sección del nervio ciático** y la **rizotomía cervical posterior**, cuya producción y control se discuten en otra parte.

## B. Estudios Morfológicos

Los métodos morfológicos comprenden una amplia variedad de técnicas. La **histología convencional** o **microscopía electrónica** pueden ser suficientes en el caso del trasplante al espacio subaracnóideo, donde las células cromafines se identifican con facilidad al estar en un ambiente extraño. Cuando el implante es en el seno del tejido nervioso y sobre todo cuando se quieren estudiar los eventuales cambios funcionales de las células y del entorno, así como la posibilidad de emisión de prolongaciones, se precisan técnicas más específicas que permitan identificar de forma inequívoca una célula como cromafín. Las técnicas histológicas no han puesto de manifiesto el desarrollo de conexiones entre las células transplantadas y las neuronas vecinas, al contrario de lo que ocurre cuando se implanta tejido embrionario procedente de la sustancia negra. Sin embargo, sí se demuestra que el implante adrenal produce catecolaminas, para lo que se usan otras técnicas histológicas. La **histofluorescencia** se basa en la creación de un compuesto, formado por la reacción del neurotransmisor con un elemento extraño, que sea fluorescente cuando se ilumina con una luz de longitud de onda determinada o que emita una luz de longitud de onda específica. Hay dos métodos para detectar catecolaminas, el método del formaldehído y el del ácido glicóxico. Más interés tienen las **técnicas inmunohistoquímicas**, basadas en la detección de las enzimas encargadas de determinados pasos metabólicos en la cadena de síntesis de las catecolaminas. Así, la tirosin-hidroxilasa permite el paso de tirosina a DOPA, y se halla en células productoras de dopamina y noradrenalina, mientras que la dopamin-β-hidroxilasa, que cataliza el paso de dopamina a noradrenalina, se halla sólo en las células noradrenérgicas. Para la detección de células cromafines basta identificar la tirosin-hidroxilasa, para lo que se usa la técnica de la peroxidasa-antiperoxidasa y se hace el estudio con microscopio óptico.

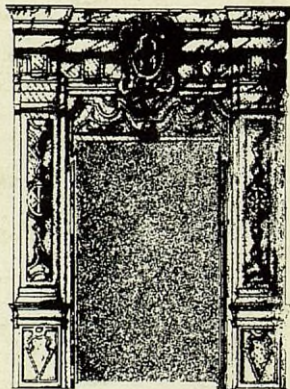
Finalmente, puede ser de interés la obtención de líquido cefalorraquídeo (LCR) para medir las concentraciones de neurotransmisores, neuropéptidos o metabolitos de los mismos. La técnica de obtención de LCR en la rata ha sido descrita en otra parte.

## REFERENCIAS

- Backlund EO, Granberg PA, Hamberger B, Knutsson E, Martensson A, Sedvall G, Seiger A, Olson L. Transplantation of adrenal medullary tissue to striatum in parkinsonism. *J Neurosurg* 62:169-173, 1985.
- Freed WJ, Cannon-Spoor HE, Krauthamer E. Intrastratial adrenal medulla grafts in rats. Long-term survival and behavioral effects. *J Neurosurg* 65: 664-670, 1986.
- González-Darder JM, Ruz-Franzi I. Acción antálgica del trasplante de médula suparrenal al espacio subaracnoideo de la rata. Estudio experimental. *Rev Esp Anesthesiol Reanim* 38:230-233, 1991.
- Heimer L, RoBards M (eds). *Neuroanatomical Tract-tracing Methods*. New York. Plenum Press, 1981.
- Madrazo I, Drucker-Colin R, Díaz V, Martínez-Mata J, Torres C, Becerril JJ. Open microsurgical autograft of adrenal medulla to the right caudate nucleus in two patients with intractable Parkinson's disease. *New Engl J Med* 316:831-834, 1987.
- Ruz-Franzi I, González-Darder JM. Study of the analgesic effects of the implant of adrenal medullary into the subarachnoid space in rats. *Acta Neurochir (Wien) suppl* 52: 39-41, 1991.
- Sagen J, Pappas G. Morphological and functional correlates of chromaffin cell transplants in CNS pain modulatory regions. *Ann NY Acad Sci* 495:306-333, 1987.
- Sladek JR, Gash M. Nerve-cell grafting in Parkinson's disease. *J Neurosurg* 68:337-351, 1988.
- Vaquero J, Martínez R, Coca S, Oya S, Salazar FG, Colado MI. Pain relief in humans by chromaffin tissue graft into medullary arachnoid. *Transplante* 1:39-42, 1989.







SERVICIO DE PUBLICACIONES

UNIVERSIDAD DE CADIZ