

*Rev. Esp. de Cir. Ost. (79-88) 1990*

FACULTAD DE MEDICINA DE ALCALÁ DE HENARES.

CÁTEDRA DE TRAUMATOLOGÍA.

PROF. A. LÓPEZ ALONSO.

FACULTAD DE MEDICINA DE LA LAGUNA

CÁTEDRA DE ANATOMÍA PATOLÓGICA.

PROF. A. DÍAZ FLORES.

HOSPITAL MILITAR "GÓMEZ ULLA".

DEPARTAMENTO DE MEDICINA Y CIRUGÍA EXPERIMENTAL.

# Regeneración del Tronco Nervioso Periférico. Estudio Experimental

L. DÍAZ FLORES; II. FRIEND SICILIA; A. LÓPEZ ALONSO; A. AZNAR AZNAR

## RESUMEN:

Los autores realizan un estudio en 24 ratas sometidas a axonectomía parcial subepineural o axonectomía y vaciamiento troncular, con objeto de valorar el comportamiento de los distintos elementos celulares del nervio durante la regeneración nerviosa. Durante el tiempo del experimento las células perineurales se conservan alrededor de un espacio virtual, lo que se interpreta como que intervienen como aislante, aún en condiciones de ausencia de fibras nerviosas, impidiendo la entrada de estructuras vasculares neoformadas y la cicatrización intraperineural. Por todo ello se postula que el papel de "guía" para el crecimiento de los axones regenerativos, atribuido fundamentalmente a las células de SCHWANN, debe ser revisado, en el sentido de dar un mayor protagonismo a las células perineurales.

Descriptores: Regeneración Nerviosa. Células de SCHWANN. Células perineurales.

## SUMMARY:

**A study of 24 rats with partial subepineural axonectomy or axonectomy with trunckular casting was made in order to value the role of the diferent cellular elements of the nerve during his regeneration. In the experiment the perineural cells persist around a virtual space. This mean that the cells works like an insulate, also in absence of nerve fibres, impeding the neoformed vessels entrance and the perineural cicatrizacion. The role of the SCHWANN cells is questioned in front of the perineural cells importance.**

**Key Words: Nerves Regeneration . SCHWANN Cells. Perineural. Cells.**

## Introducción

El tronco nervioso periférico esta formado por las fibras nerviosas recubiertas o no de una capa de mielina y una envoltura conjuntiva, que no existe en el Sistema Nervioso Central y que se dispone dando lugar al endoneuro, perineuro y epineuro.

Cuando se lesiona un nervio periférico seccionándose algunas fibras nerviosas, aunque el papel fundamental en los fenómenos regenerativos corresponde a la fibra nerviosa proximal, todos los restantes elementos del mismo, participan de una u otra manera para que esta regeneración sea posible.

El presente trabajo tiene como objetivo el valorar el comportamiento de los distintos elementos celulares, o no, en los fenómenos regenerativos del nervio cuando es sometido a vaciamiento axonal subepineural, eliminando un fragmento de varias fibras nerviosas, pero conservando el resto de componentes del mismo.

## Material y Método

Se hace un estudio en 24 ratas albinas, raza Sprague-Dawley, machos, con pesos comprendidos entre 410 y 500 gr. y distribuidas en dos series homogéneas de 12 ratas cada una.

*Serie nº 1. Axonectomía parcial subepineural.*- Los 12 animales de esta serie fueron intervenidos bajo anestesia con ketamina en inyección intraperitoneal (1). Para ello, la rata una vez anestesiada, se coloca en decúbito prono y con las extremidades en extensión se realiza una incisión ventral siguiendo el eje longitudinal del fémur, en la pata izquierda, una vez identificado el nervio

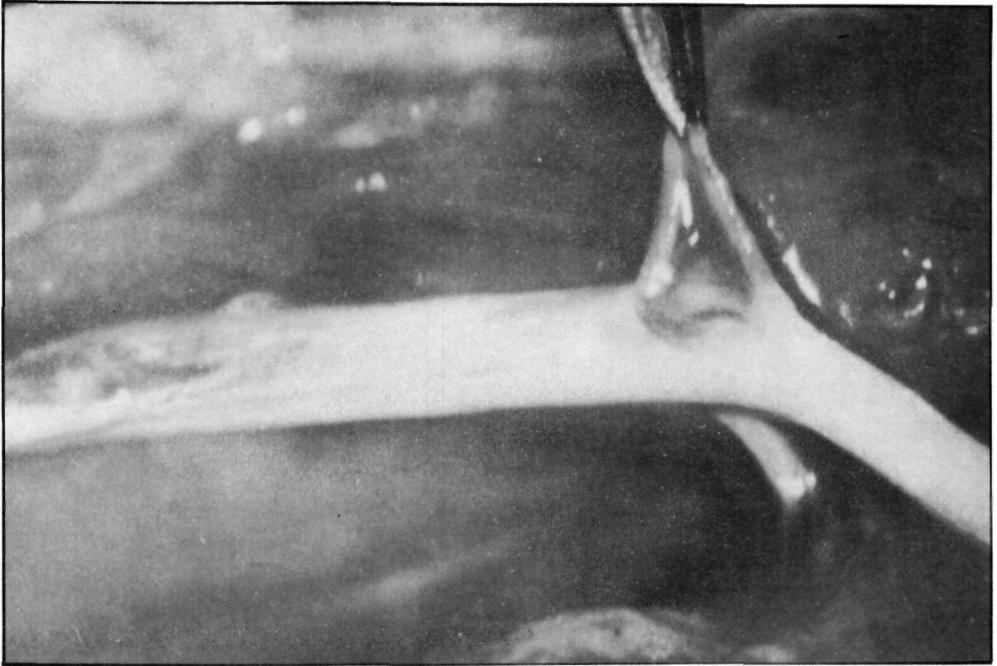
ciático se manipula suavemente y se cierra la incisión por planos. En la pata derecha una vez identificado el nervio ciático en su recorrido anatómico de la región glútea y tercio superior de la pata se procede del siguiente modo:

Bajo control y visión microscópica se libera el nervio ciático en unos 2 cm de recorrido y se procede a seccionar transversalmente el epineuro, abriendo una pequeña ventana, a través de la cual se liberan los fascículos nerviosos y tras la apertura de una ventana en el perineuro, se seccionan transversalmente los axones. A continuación se libera el nervio a 1 cm de distancia proximalmente, se secciona transversalmente el epineuro y se liberan los fascículos intervenidos; posteriormente se abre una ventana en el perineuro a través de la cual se exteriorizan los axones seccionados distalmente, mediante tracción y se dejan libres en los tejidos circundantes (Figura nº 1).

Posteriormente los animales se van sacrificando en lotes de tres a los 3, 7, 10 y 15 días respectivamente. En el momento del sacrificio se obtiene muestra de ambos nervios ciáticos intervenidos y se incluyen en formol al 10% para estudio por microscopía óptica, o bien en glutaraldehído y tetróxido de osmio ambos amortiguados en soluciones buffer de fosfatos, según MILLONING a pH 7'4, para estudio por microscopía electrónica.

*Serie nº 2. Axonectomía y Vaciamiento Troncular.*- En esta serie se procede del mismo modo que en la serie anterior solo que haciendo un vaciamiento troncular completo en la pata derecha intervenida. Posteriormente los 12 animales se van sacrificando en lotes de 3 a los 3, 7, 10 y 15 días y se obtienen las muestras de ambos nervios ciáticos para su estudio.

En todas las muestras fijadas en formol al 10%, una vez deshidratadas e incluidas en parafina, se hicieron cortes de 6 micras de



**Figura nº 1:** Aspecto de la técnica de vaciamiento subepineural. Obsérvese la apertura distal del epi y perineuro y la tracción de los grupos de axones a través de la incisión proximal.

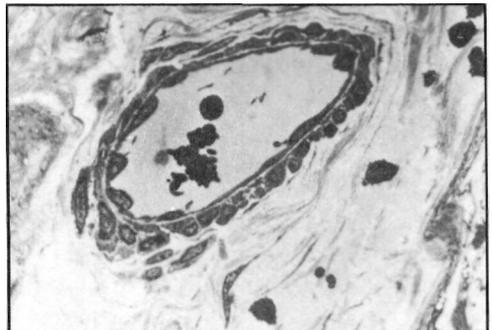
espesor y se tiñeron con Hematoxilina-Eosina, Van GIESON y tricrómico de BRAUN, para su estudio por microscopia óptica.

### Resultados

Todas las muestras del nervio ciático izquierdo, o controles, fueron normales. De su estudio solamente queremos destacar que en todos ellos el epineuro aparece bien desarrollado y constituido por diferentes componentes celulares e intersticiales. En cortes seriados se pudo poner de manifiesto que en su superficie se apoyan y discurren numerosas formaciones vasculares linfáticas y sanguíneas, correspondientes a arterias de pequeño calibre y arteriolas, así como a vénulas y pequeñas venas, que se continúan con vasos de territorios próximos y en profundidad, al atravesar escalona-

damente el resto de la capa epidural (Figura nº 2).

En el epineuro se aprecia la existencia de tejido fibroso, en el que se distinguen fibroblastos y abundantes fibras colágenas de disposición longitudinal,



**Figura nº 2:** Características en corte semifino, de una arteriola presente en el epineuro del nervio ciático.

así como algunas fibras elásticas. En su parte más interna se observan varias capas de células, cuyo aspecto recuerda al de las células perineurales. El epineuro propiamente dicho se continua en profundidad por tractos conectivos que portan los vasos penetrantes y que quedan intercalados entre las superficies de lo que se conoce como perineuro.

El perineuro está constituido por células perineurales y componente intercelular, que son atravesados ocasionalmente por finos vasos sanguíneos. Las células perineurales son aplanadas, muestran núcleos lenticulares y se disponen en variable número de capas en relación con el diámetro del fascículo. Ultraestructuralmente se observan membranas de cubierta, con numerosas vesículas de picnocitosis, que envuelven un citoplasma laminar, con escasas organelas. Las células entran en contacto con las dispuestas en su misma capa, para constituir una cubierta continua, salvo en los sitios de penetración vascular, y en su superficie presentan una manifiesta membrana basal.

El endoneuro esta constituido, a su vez por capilares sanguíneos penetrantes a través del perineuro, con sus cubiertas propias, elementos del conectivo propiamente dichos y componentes intesticiales aparentemente de naturaleza conectiva, formados por células perineurales.

Las fibras nerviosas aparecen rodeadas por sistemas cilindricos formados, unos por las células de SCHWANN dispuestas en capa unicelular inmediatamente adosada a la fibra nerviosa miélnica o amielínica (Figura nº 3), y otros por células perineurales dispuestas por

una o varias capas de células, dependiendo del grosor del fascículo. Por lo general oscilan entre 3 y 6.

En cuanto a las muestras obtenidas de la parte derecha, sometidas a AXONECTOMÍA PARCIAL SUBEPINEURAL o AXONECTOMÍA y VACIAMIENTO TRONCULAR, macroscópicamente mostraban en los diferentes tiempos del experimento una manifiesta atrofia del área central, de tal modo era muy difícil establecer el trayecto primitivo del nervio, y la formación de una masa más o menos voluminosa, alrededor del área donde se había efectuado la apertura proximal en el nervio, la cual se continuaba con el trayecto proximal de este

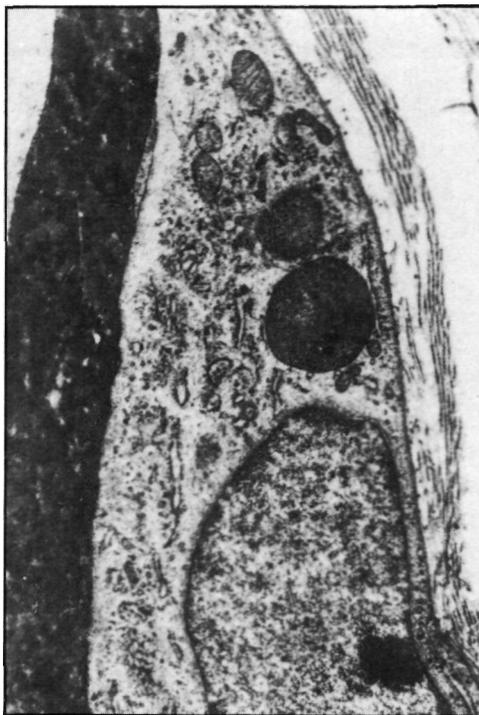
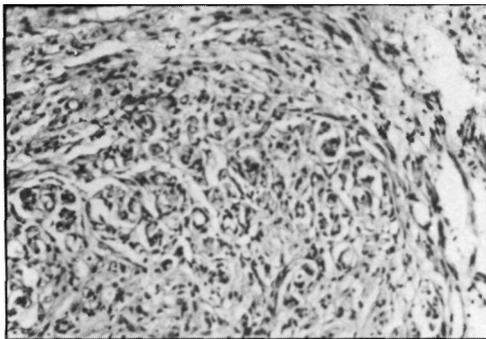


Figura nº 3: Características por microscopía electrónica de la célula de SCHWANN, rodeada por membrana basal e íntimamente adosada a la cubierta axonal.

último. El cabo distal estaba disminuido discretamente de calibre.

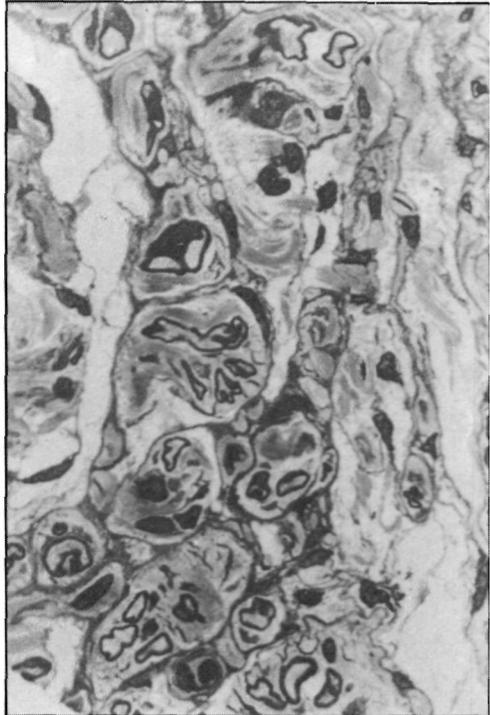
Los estudios de microscopía óptica mostraban en el área proximal hechos morfológicos correspondientes a los englobados bajo el concepto de neurona de amputación, distinguiéndose numerosas fibras nerviosas desorganizadas y dispuestas en todas direcciones (Figura n° 4). Dichas fibras aparecen rodeadas por células de SCHWANN e inmersas entre tejido fibroso que separa las unas de las otras (Figura n° 5 y 6). Alrededor de varias fibras o de cada una de éstas se observan siempre células perineurales delimitantes (Figura n° 7). Según el momento evolutivo, las fibras nerviosas presentan signos regresivos o bien de regeneración de sus cilindroejes, a la vez que las células de SCHWANN proliferan anárquicamente y se determina neoangiogénesis y proliferación fibroblástica (Figura n° 8).

En el segmento distal se comprueban todos los hechos de la degeneración walleriana, es decir, desintegración de neurofibrillas, fragmentación del axon y

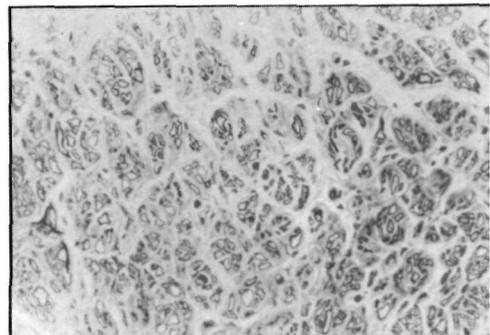


**Figura 4:** Características del área de axonectomía proximal, donde se observan numerosas fibras nerviosas desorganizadas y dispuestas en todas direcciones; entre las fibras se aprecia abundante tejido conjuntivo.

retracción longitudinal. A ello se suma la alteración de la mielina con ensanchamiento de los nódulos de RANVIER y de los espacios de SCHMIDT-LANDERMANN, así como formación de fragmentos elipsoides. Por su parte, las célu-



**Figura n° 5:** Detalle de células perineurales abarcando fibras nerviosas aisladas en el área que simulan a un neuroma de amputación.



**Figura n° 6:** Imagen en corte semi-fino del área de desorganización fibrilar.

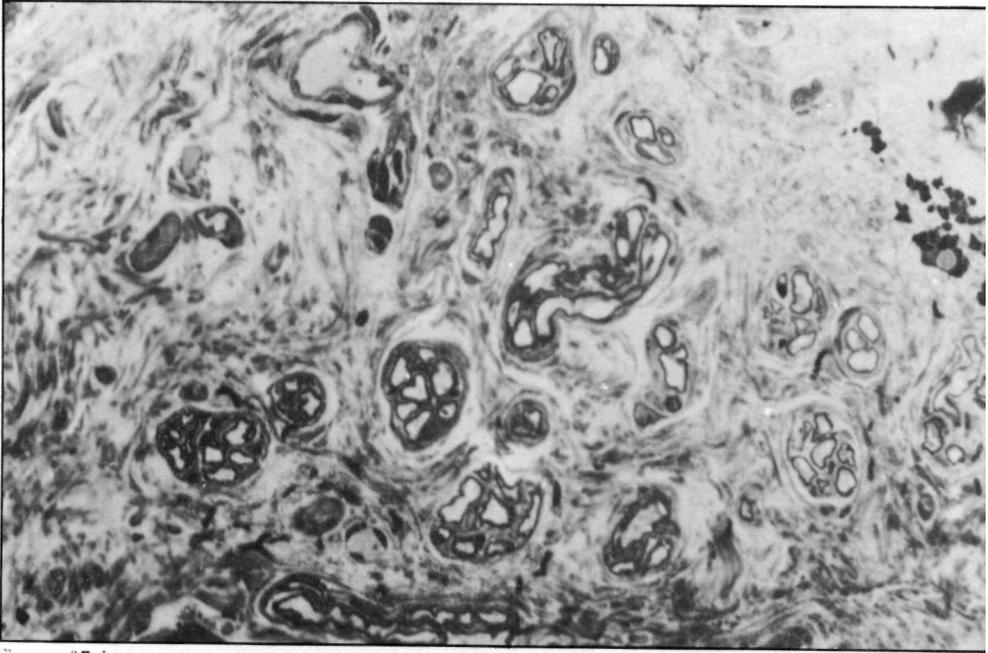


Figura nº 7: Imagen en corte semi-fino del área de desorganización fibrilar. Obsérvese el tejido conjuntivo de reparación

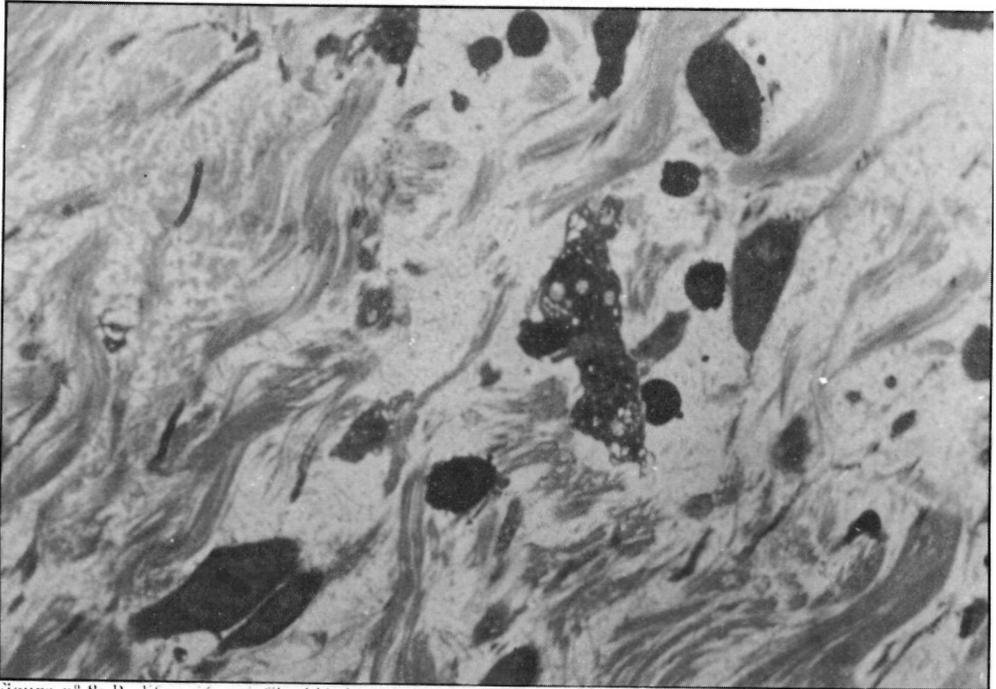


Figura nº 8: Proliferación miofibroblástica e infiltración de macrófagos entre el tejido fibroso bordeante al muñón nervioso seccionado.

las de SCHWANN proliferan y dan origen a los cuerpos de BÜNGNER.

En la zona intermedia, desprovista de axones hemos apreciado que las células perineurales delimitantes de los fascículos se conservan alrededor de un espacio virtual (Figura nº 9).

### Discusión

De las observaciones realizadas en los nervios controles, podremos sacar la consecuencia de que en el nervio ciático normal, los elementos celulares y conjuntivo-vasculares pueden agruparse en dos grandes apartados:

a) Tejido conjuntivo que penetra en el mismo y acompaña a la microvascularización, cuya procedencia embriológica es mesodérmica; y

b) Componentes del tejido conjuntivo formados por las células de las envolturas de fibras nerviosas y fascículos (Células de SCHWANN y células perineurales) cuya procedencia es la cresta neural.

Estos últimos elementos rodean a las fibras nerviosas formando sistemas cilindricos concéntricos que nosotros denominamos "cubierta laminar no conjuntivo-vascular" y que están formados por las células de SCHWANN y por las células perineurales respectivamente. Las células de SCHWANN forman una cubierta laminar unicelular inmediatamente adosada a la fibra nerviosa miélnica o amielínica. Las células perineurales forman el perineuro, que puede considerarse como un cilindro, formado a su vez por una o varias capas de células,

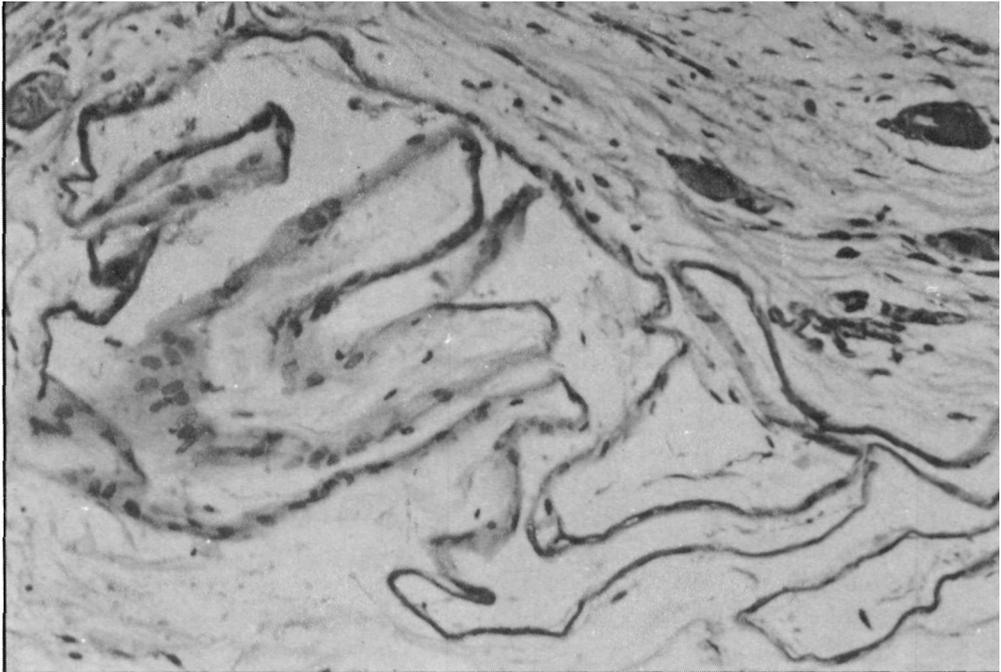


Figura nº 9: Obsérvese cómo después de la axonectomía subepineural se conserva el perineuro durante largos periodos sin penetración de tejido de organización en el espacio cavitario que delimita.

normalmente de 3 a 6, en relación con el grosor del fascículo.

La "axonectomía parcial subepineural", al dejar la cubierta perineural sin afectar prácticamente su continuidad en un largo segmento nos va a permitir conocer mejor la capacidad de respuesta del perineuro y epineuro y estudiarlo comparativamente al comportamiento de las células de SCHWANN cuyo importante papel ha sido tradicionalmente en la regeneración del tronco nervioso periférico.

Algunos autores (2, 3) han efectuado corte del nervio ciático con el objeto de conocer la influencia que el muñón distal ejerce sobre el cabo proximal, ideando la colocación de cámaras cilíndricas subendoteliales que dejan los muñones, proximal y distal, separados por un espacio de 10 mm (2) o de cámaras de silicona con un espacio inter-muñón de 6 mm (3). Estas experiencias les permitieron señalar la dependencia que la regeneración proximal mantenía con respecto a la presencia o no de muñón distal.

Además de los sistemas previamente expuestos, se han utilizado manguitos arteriales (4), milipore (5, 6, 7, 8), tubos de silicona para rodear áreas de sutura (9), etc.

Como hemos expuesto estas experiencias se han planteado para comprobar la acción del muñón distal a los tejidos "diana", ya que múltiples estudios efectuados in vitro demuestran que neuronas sensoriales sinápticas (10, 11) y motoras (12) no sobreviven a menos que sean suplementadas con sustratos condicionados por las células de SCHWANN.

En el mismo orden de cosas, múltiples autores (13, 14, 15, 16) han precisado que la contribución periférica esencial al crecimiento nervioso proximal es la estructura conductora formada por el crecimiento celular del muñón distal. Tal y como se ha demostrado en cultivos de tejidos existe un "factor estimulador de neuritas" capaz de determinar el crecimiento de prolongación en la superficie celular de neuronas en cultivo (17, 18, 19).

Por nuestra parte, nos interesa estudiar el comportamiento del perineuro cuando no hay continuidad axónica. A este fin desviábamos los axones proximales seccionados hacia el espacio conectivo intersticial, para evitar el posible crecimiento de dichos axones. De esta manera persistía un amplio espacio recubierto de células perineurales, sin presencia de fibras en su interior, aunque en el acto operatorio pudiesen producirse pequeñas extravasaciones sanguíneas en el interior de esta cavidad.

Los resultados obtenidos han sido muy demostrativos y se pueden resumir en el hecho de que las células perineurales se conservan alrededor de un espacio virtual. Esto tiene, a nuestro criterio, una gran importancia, ya que pone de manifiesto lo siguiente: 1) El perineuro tiene una gran capacidad aislante, aún en condiciones de ausencia de las fibras nerviosas. 2) Dicha capacidad se extiende a impedir la entrada de estructuras vasculares neoformadas, hecho que es propio de la mayor parte de los territorios orgánicos y de los que el espacio envuelto por el perineuro es una de las expresiones. 3) No se produce multiplicación de las capas perineurales en ausencia de fibras nerviosas. 4) La per-

sistencia del perineuro permite postular que su capacidad de guía persiste aún en ausencia de las fibras nerviosas y probablemente cuando estas se alteran.

La mayor parte de los autores dan gran importancia como "guía" de crecimiento en el muñón distal a las células de SCHWANN. Nosotros opinamos que indudablemente, dichas células deben tener un papel fundamental como inductor del crecimiento, al cual se pueden sumar otras estructuras del segmento distal. No obstante, no nos parece que el papel de "guía" del crecimiento sea propiamente de estas células, en virtud de las siguientes consideraciones: 1) Las células de SCHWANN tienen una disposición segmentaria, interrumpida en los nódulos de RANVIER 2). Cuando se producen los fenómenos alterativos en el muñón distal, hay una cierta desordenación de este componente celular, que en parte engloba la mielina procedente de sus propias membranas y adopta configuración globulosa.

Por todo ello pensamos que la función fundamental de "guía de crecimiento" corresponde a la célula perineural que es la que mantiene la continuidad anatómica a lo largo de todo el trayecto nervioso y que es la que no experimenta fenómenos de discontinuidad, ni de cambio de morfología durante el periodo de tiempo en que el cabo distal es receptivo a la reinervación.

Los hechos reseñados se confirman al estudiar la "reacción que se produce en el muñón proximal desviado", cuando se realiza la axonectomía. Efectivamente, observamos que se originaba a modo de "neurona de amputación", pero que cada fibra, o pequeño grupo de fibras

que inician su crecimiento, queda siempre envuelta por prolongaciones originadas en la envoltura perineural seccionada proximalmente.

Por todo ello se puede postular que el papel de "guía" para el crecimiento de los axones regenerativos, atribuido fundamentalmente a las células de SCHWANN debe ser revisado, en el sentido de dar un mayor protagonismo a las células perineurales.

### Bibliografía

1. LOPEZ ALONSO, A.; AZNAR AZNAR, A.; FIEND SICILIA, II.; DIAZ FLORES, L.: Estudio experimental de la neuropatía por compresión en el nervio ciático de la rata después de la descompresión quirúrgica. *Rev. Esp. de Cir. Ost.* 1990, 25: 101-116.
2. LUNDBORG, G.; DAHLIN, L. B.; DANIELSEN, N.; HANSSON, H. A.; LARSSON, K.: Reorganization and orientation of regenerating nerve fibers, perineurium and epineuriemin pre-formed mesothelial tubes, An experimental study on the sciatic nerve of rats. *J. Neurosci. Res.* 1981, 6: 265-281.
3. LUNDBORG, G.; GELBERMAN, R.H.; LONGO, F. M.; POWELL, H. C.; VARÓN, S.: Nerve regeneration in silicone chambers: growth across a six millimeter gap. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* in press.
4. WEISS, P.; TAYLOR, A. C.: Histomechanical analysis of nerve reunion in the rat after tubular splicing. *Arch. Surg.* 1943, 47: 419-447.
5. BASSETT, C. A.; CAMPBELL, J. B.; HUSBY, J.: Peripheral nerve and spinal cord regeneration: factors leading to success of a tubulation technique employing millipore. *Exp. Neurol.* 1959. 1: 386-406.

6. CAMPBELL, J. B.; BASSETT, C. A. L.; HUSBY, J.; THULIN, C. A.; FERINGA, E. R.: Microfilter sheaths in peritheral nerve surgery: a laboratory report and preliminary clinical study. *J. Trauma*. 1961, 1: 139-158.
7. NOBLACK, C. R.; HUSBY, J.; GIRADO, J. M.; BASSETT, C. A. L.; CAMPBELL, J. B.: Neuronal regeneration across long gaps in mammalian peripheral nerves: early morphological findings. *Anat. Rec.* 1958, 131: 633-647.
8. SJOSTRAND, J.; CARLSSON, C. A.: Regeneration of ventral roots (a histological study in cats). *Acta Anat.* 1969, 74: 532-546.
9. HUDSON, A.; MORRIS, J.; REDMAN, P.; WEDDELL, G.: An electron microscopic study of regeneration in severed rat sciatic nerves anastomosed with silastic cuffs. *Top. Surg. Res.* 1971, 3: 187-190.
10. VARON, S.; SKAPER, S. D.; MANTHORPE, M.: Trophic activities for dorsal root and sympathetic ganglionic neurons in media conditioned by SCHWANN and other peripheral cells. *Dev. Brain Res.* 1981, 1: 73-87.
11. VARON, S.; MANTHORPE, M.: Schwann cells: an in vitro perspective. In Feodoroff, S. and Hertz, L. eds.: "Advances in Cell Neurobiology". Academic Press. New York. 1982, 3: 35-95.
12. LONGO, F. M.; MANTHOPER, M.; VARON, S.: Spinal cord neurotrophic factors (SCNTFs): I. Bioassay of Schwannoma and other conditioned media. *Dev. Brain. Res.* 1982, in press.
13. DENNY-BROWN, D.: Importance of neural fibroblast in the regeneration of nerve. *Arch. Neurol. Psychiatr.* (Chicago). 1946, 55: 171-215.
14. JURECKA, W.; AMMERER, H. P.; LASSMANN, H.: Regeneration of a transected peripheral nerve. A autoradiographic and electron microscopic study. *Acta Neuropathol* (Berlin). 1975, 32: 299-312.
15. THOMAS, P. K.: The cellular response to nerve injury. *J. Anat.* 1966, 100: 287-303.
16. YOUNG, J. Z.; HOLMES, W.; SANDERS, F. K.: Nerve regeneration. Importance of the peripheral stump and the value of nerve grafts. *Lancet*. 1940, 1: 128-130.
17. ADLER, R.; MANTHORPE, M.; SKAPER, S. D.; VARON, S.: Polyornithine-attached neurite-promoting factors (PNPFs) culture sources and responsive neurons. *Brain Res.* 1981, 206: 129-144.
18. ADLER, R.; VARON, S.: Neuritic guidance by nonneuronal cells of ganglionic origin. *Devel. Biol.* 1981, 86: 69-80.
19. VARON, S.; ADLER, R.: Trophic and specifying factors directed to neuronal cell. In FEDEROFF S and HERTZ L eds: "Advances in Cell Neurobiology". Academic Press. New York. 1981, 2: 115-163.