



Desarrollo de técnicas neuroquirúrgicas en dos modelos animal de experimentación



Development of neurosurgical techniques in two animal models of experimentation



Ganador del Premio "Domingo Mansi 2015" al mejor trabajo de Anatomía Experimental o de Investigación

Unda Velasco, Santiago R.

Instituto de Biotecnología, Centro de Investigación e Innovación Tecnológica de la Universidad de La Rioja (CENIIT) La Rioja - Argentina

E-mail de autor: Santiago R. Unda Velasco santiagounda94@gmail.com

Resumen

La investigación básica ha generado gran cantidad de información en lo referente al conocimiento del sistema nervioso tanto en su situación fisiológica como en diferentes situaciones patológicas, estos conocimientos han logrado importantes avances que son resultado de la aplicación de distintos modelos experimentales que han tenido como propósito estudiar la capacidad de regeneración neuronal en animales de laboratorio, especialmente mediante la implementación de técnicas neuroquirúrgicas con las cuales se intenta reproducir un daño o lesión nerviosa.

El objetivo de nuestro trabajo fue caracterizar dos modelos de lesión animal, la axonotmesis de nervio ciático (ANC) y la constricción crónica de nervio ciático (CCN) en ratas, a los fines constituir una herramienta para estudios de la medicina traslacional.

En el presente trabajo se desarrollaron dos modelos de lesión nerviosa periférica, la lesión mediante el pinzamiento del nervio ciático (ANC) y la constricción crónica del nervio ciático (CCN) los cuales fueron llevados a cabo en el laboratorio del Instituto de Biotecnología del Centro de Investigación e Innovación Tecnológica (CENIIT) de la Universidad Nacional de La Rioja, Argentina.

Se utilizaron ratas Wistar adultas (Bioterio CENIIT, 200-250 g de peso), mantenidas en condiciones estándar, cumplimentando las normas y protocolos vigentes para el cuidado de animales de laboratorio (Canadian Council on Animal Care, 1993). El protocolo a seguir previo a la intervención quirúrgica ha sido aprobado por el Comité de Ética del Instituto de Biotecnología de la UNLaR (CICUAL-UNLAR).

Durante la aplicación de los modelos de Constricción Crónica de Nervio Ciático (CCN) y Axonotmesis de Nervio Ciático (ANC), se detallaron distintos parámetros a considerar que pueden ser útiles al momento de ser realizados por el investigador, tales como dificultad, tiempo, grado de invasión, variabilidad de la técnica, respuesta nociceptiva, regeneración neuronal.

Las técnicas neuroquirúrgicas aplicadas constituyen una herramienta valiosa para la investigación de distintos aspectos relacionados del sistema nervioso como su regeneración, su respuesta nociceptiva y los cambios histopatológicos que se pueden trasladar a las patologías de la clínica. Es importante la descripción detallada de los protocolos actualmente utilizados para así reducir la variabilidad de la aplicación de los mismos.

Palabras clave: medicina traslacional, axonotmesis, nervio ciático

Abstract

Basic research has generated a great amount of information regarding the knowledge of the nervous system both in its physiological situation and in different pathological situations, this knowledge have achieved important advances that are the result of the application of different experimental models that have had as purpose to study The capacity of neuronal regeneration in laboratory animals, especially through the implementation of neurosurgical techniques with which an attempt is made to reproduce a nerve damage or injury.

The aim of our study was to characterize two models of animal injury, sciatic nerve axonotmesis (ANC) and chronic constriction of sciatic nerve (CCN) in rats, in order to constitute a tool for studies of translational medicine.

In the present work, two models of peripheral nerve injury, sciatic nerve impingement (NCA) and chronic constriction of the sciatic nerve (CCN) were developed, which were carried out in the laboratory of the Biotechnology Institute of the Center for Research and Technological Innovation (CENIIT) of the National University of La Rioja, Argentina.

Adult Wistar rats (Bioterium CENIIT, 200-250 g in weight) were kept in standard conditions, complying with the standards and protocols for the care of laboratory animals (Canadian Council on Animal Care, 1993). The protocol to be followed prior to surgery has been approved by the Ethics Committee of the Institute of Biotechnology of the UNLaR (CICUAL-UNLAR).

During the application of the models of Chronic Constriction of Sciatic Nerve (CCN) and Axonotmesis of Sciatic Nerve (ANC), different parameters to be considered that can be useful at the moment of being realized by the researcher, such as difficulty, time, degree Of invasion, variability of technique, nociceptive response, neuronal regeneration. The applied neurosurgical techniques constitute a valuable tool for the investigation of different related aspects of the nervous system as its regeneration, its nociceptive response and the histopathological changes that can be transferred to the pathologies of the clinic. It is important the detailed description of the protocols currently used to reduce the variability of the application of the same.

Keywords: translational medicine, axonotmesis, sciatic nerve

Introducción

Entre los primeros estudios en los cuales se sustenta la neurobiología moderna se encuentran los realizados por Ramón y Cajal, y sobre todo Tello, uno de sus discípulos, ambos hicieron reveladoras observaciones en torno a la capacidad regeneradora de los sistemas nerviosos periférico y central,¹ en los cuales se demostró que estos dos sistemas nerviosos presentan distintas formas de regeneración.

Así, mientras que en el SNP las neuronas son capaces de regenerar espontáneamente sus axones y, en el mejor de los casos, alcanzar sus dianas desnervadas restableciendo contacto sináptico con ellas, en el SNC los axones dañados no presentan esta facultad "auto-reparadora".²

Siguiendo esta línea, la investigación básica ha generado gran cantidad de información en lo referente al conocimiento del sistema nervioso tanto en su situación fisiológica como en diferentes situaciones patológicas,³ estos conocimientos han logrado importantes avances que son resultado de la aplicación de distintos modelos experimentales que han tenido como propósito estudiar la capacidad de regeneración neuronal en animales de laboratorio, especialmente mediante la implementación de técnicas neuroquirúrgicas con las cuales se intenta reproducir un daño o lesión nerviosa.

Estas técnicas han servido para investigar el proceso que se lleva a cabo en el sistema nervioso y para entender mejor su capacidad de regeneración parcial y completa;⁴ esta posible reparación del nervio depende de los distintos grados de lesión nerviosa periférica que se realice, tomando como referencia los 5 grados de establecidos por Sunderland, el cual toma la neuropraxia y la neurometosis realizado por Hebert Seddon (Seddon, 1942⁵, 1943⁶) y divide la axonotmesis en 3 grados de injuria que tienen progresivamente peor pronóstico de regeneración espontánea (Sunderland, 1951).⁷

La lesión en el nervio ciático se ha estandarizado con distintos modelos que logran representar todos los grados de lesión nerviosa explicados previamente, entre los cuales se ha utilizado ligaduras con distintos grados de compresión en el nervio, así como también la colocación de manguitos de polietileno y la axonotmesis mediante pinzamiento.

El desarrollo de técnicas neuroquirúrgicas que logren tener menor porcentaje de error humano y sean de fácil estandarización han sido fundamental para el avance de las neurociencias que se enfocan en el estudio de la regeneración nerviosa y la neuropatía periférica, estos modelos experimentales suponen actualmente la mejor herramienta para el estudio de los mecanismos subyacentes a las lesiones⁸ que

se intentan reproducir.

La utilidad de estas técnicas neuroquirúrgicas ampliamente usadas en el campo de las neurociencias se justifican en medida que contribuyan a conocer la fisiopatología de distintos cuadros clínicos, así como a probar nuevos fármacos ya que a pesar de tener limitaciones las representaciones animales, pueden ayudar a predecir la utilidad terapéutica de nuevos medicamentos.⁹

El objetivo del presente trabajo es desarrollar y reproducir el modelo de ligadura laxa y de axonotmesis por pinzamiento realizados en el nervio ciático de ratas de laboratorio y a la vez hacer una descripción de los protocolos utilizados en ambos procedimientos con el fin de aportar a los conocimientos de los avances en técnicas quirúrgicas aplicadas a las neurociencias.

Materiales y métodos

En el presente trabajo se desarrollaron dos modelos de lesión nerviosa periférica, la lesión mediante el pinzamiento del nervio ciático (ANC) y la constricción crónica del nervio ciático (CCI) los cuales fueron llevados a cabo en el laboratorio del Instituto de Biotecnología del Centro de Investigación e Innovación Tecnológica (CENIIT) de la Universidad Nacional de La Rioja, Argentina.

Se utilizaron ratas Wistar adultas (Bioterio CENIIT, 200-250 g de peso), mantenidas en condiciones estándar, cumplimentando las normas y protocolos vigentes para el cuidado de animales de laboratorio (Canadian Council on Animal Care, 1993).

El protocolo a seguir previo a la intervención quirúrgica ha sido aprobado por el Comité de Ética del Instituto de Biotecnología de la UNLaR (CICUAL-UNLAR).

1. Reactivos

- Ketamina, 50 mg/ml
- Xylacina, 2% (w/v) solución.
- 70% (v/v) etanol en agua
- YodoPovidona solución
- Lubricante ocular

2. Materiales de cirugía

- Pesa para ratas de laboratorio
- Fórceps Adson de microdissección 1 x 2 con dientes
- Tijeras de microdissección
- Fórceps de microdissección curvados.
- Soporte de aguja
- Cat-gut crómico 4-0.
- Pinzas de relojero rectas
- Pinzas de relojero anguladas
- Aguja de sutura
- Nylon 4-0 para suturar piel
- Algodón
- Gasa
- Guardapolvo
- Guantes de latex

Resultados

Protocolo de procedimiento

Se procedió a pesar a los grupos con el objetivo de poder evaluar el normal crecimiento y desarrollo de los animales durante el tiempo post operatorio.

1. Anestesia

Iniciamos el protocolo quirúrgico, iniciando la anestesia preoperatoria, mediante la administración intraperitoneal de ketamina (50 mg/kg) más xylacina (2 mg/kg), (Imalgene® 1000 y Rompún®), según el peso de cada animal.

Posteriormente, se comprueba el anestésico – miorraelajante mediante la falta reflejos (palpebral y de la pata del animal). Para establecer unas condiciones de asepsia mínimas del campo quirúrgico se procedió a su rasurado en seco en la región dorsal del miembro inferior, desde la línea media hasta más abajo de la articulación de la rodilla.

2. Procedimiento Quirúrgico de la Axonotmesis

Se palpó con las yemas de los dedos el trocánter mayor y lateralmente a 1cm del fémur se realizó una incisión en la piel posterior del muslo de 1.5cm (**Fig. 1**), con tijeras de micro-dissección.

Luego se introdujo las tijeras con la punta cerrada a una profundidad de 0.5cm del bíceps derecho, a 1cm lateral del trocánter mayor y a 0.5-1cm del fémur.

Posteriormente se expuso el nervio ciático con pinzas curvas. Usando el fórceps para mantener la apertura, se colocó los extremos de la pinza curva a los dos lados del nervio, presionando fuertemente por 10 segundos, esto produce una breve contracción de la pata, posteriormente se retira la pinza y posteriormente se repite nuevamente el procedimiento. (**Fig. 2**)

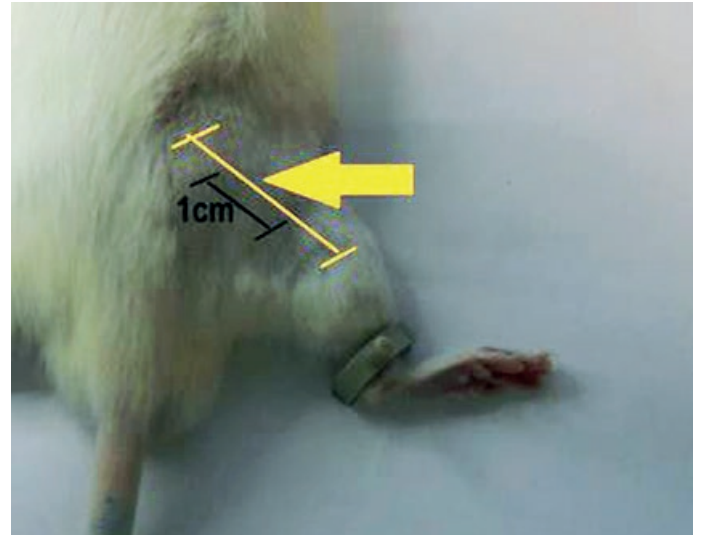


Fig. 1: La flecha señala la localización del nervio ciático a 1cm del trocánter mayor

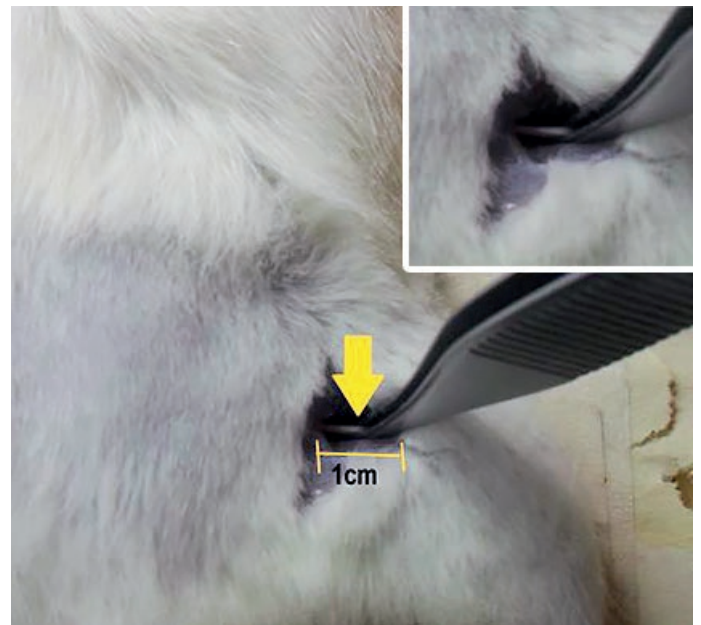


Fig. 2: La flecha señala la ubicación quirúrgica y pinzamiento del nervio ciático. Incisión de 1 cm

3. Procedimiento Quirúrgico de la Ligadura Laxa

Exponer el nervio ciático de igual manera que en el procedimiento anterior, colocar el separador de los músculos de manera tal que deje una abertura suficiente en la cual se pueda observar el tronco del nervio sin problema, (**Fig. 3**)

colocar con delicadeza 4 ligaduras flojas de tripa cromada 4-0 (**Fig. 4**) las cuales se separan con apenas pocos milímetros de distancia, (**Fig. 5**) con especial cuidado de no comprimir demasiado al nervio, coser el plano muscular y la piel.



Fig. 3: Abertura de la CCN de aprox. 3,5 cm. 1. Tronco de nervio ciático



Fig. 4: Ligadura laxa del nervio ciático con cat gut crómico

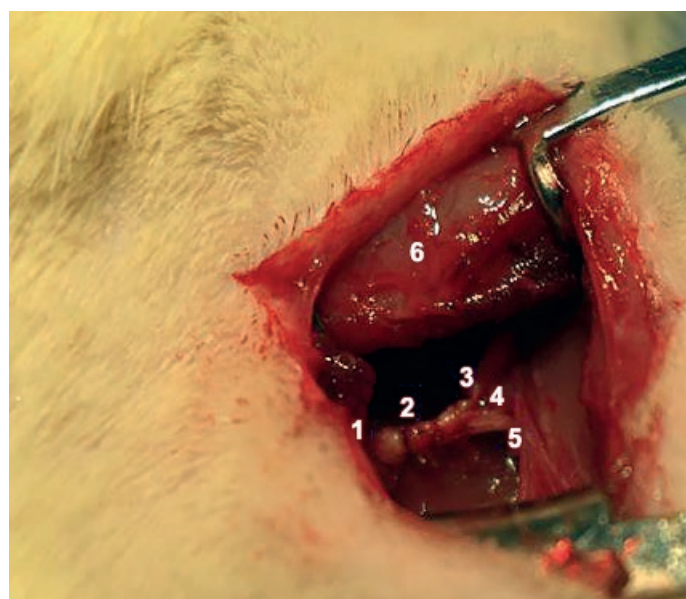


Fig. 5: Visualización de las ligaduras. 1. Tronco de NC, 2. Ligadura, 3. Nervio peroneo, 4. Nervio tibial, 5. Nervio safeno, 6. Músculo glúteo

4. Cuidado post-operatorio

Los efectos de la anestesia finalizaron a los 20 min de la cirugía, se administraron antibióticos: calimicina® LA (Oxite-traciclina) a dosis de 60 mg por cada kg de peso cada 72 h, por inyección subcutánea interescapular, según pauta veterinaria. La herida quirúrgica fue controlada hasta su cicatrización.

5. Observaciones de los procedimientos

Durante la aplicación de los modelos de Constricción Crónica de Nervio Ciático (CCN) y Axonotmesis de Nervio Ciático (ANC), se observaron distintos parámetros a considerar que pueden ser útiles al momento de ser realizados por el investigador.

MODELO	DIFICULTAD	TIEMPO	INVASIVO	VARIABILIDAD	NOCICEPCION	REGENERACION
CCN	±	20 - 30"	+	±	+	±
ANC	-	5 - 10 "	-	-	+	+

Dificultad (± = intermedio y - = menor grade dificultad).

Tiempo (desde que empieza hasta terminar la cirugía, sin contar el tiempo necesario para que la anestesia haga efecto).

Invasivo (+ = mayor grado de compromiso y técnica cruenta y - = técnica poco cruenta, sin embargo en ambas es importante la experiencia del investigador).

Variabilidad (± = grado intermedio, influye la compresión realizada por el operador durante el procedimiento y - = poca variabilidad, la compresión por pinzamiento no varía por la fuerza sino por el tiempo de pinzamiento).

Nocicepción (+ = útil para evaluar repuestas nociceptivas de investigación).

Regeneración (± = es posible tener un grado intermedio de regeneración y recuperación de motora y sensitiva parcial y + = útil y según el grado de axonotmesis puede evolucionar a una regeneración y recuperación total o parcial en días o meses).

Tabla 1: Parámetros observados en los modelos de CCN Y ANC

Discusión

El desarrollo de estos modelos animal muestra sin dudas como el avance de las técnicas neuroquirúrgicas debe orientarse a reducir la variabilidad producida por distintas cuestiones tales como error humano al momento de aplicar un método; esto representará un posible obstáculo para el investigador que desee poner en marcha un modelo, ya que al no poder llevarlo a cabo con precisión difícilmente logrará representar con fidelidad las situaciones que se presentan en la clínica.

En el caso de los dos modelos representados en este trabajo se evidencian distintos grados de lesión nerviosa periférica. En la ligadura laxa de nervio ciático se trata de una neuropraxia que generará dolor crónico en el animal de experimentación, un modelo que sin lugar a dudas es muy útil al momento de poner en marcha tratamientos experimentales que reduzcan las respuestas nociceptivas y que alivien el dolor, sin embargo en este modelo existe cuestiones de

la técnica que aumentan la variabilidad, una de estas es el grado de daño a nivel muscular que se tiene que realizar para poder visualizar un buen porcentaje del tronco nervioso y la segunda es el grado de compresión que se realiza, pues si esta es demasiado fuerte se generará una neurometosis, lesión que tendrá características distintas a la neuropraxia, claro está que también se tiende a la generación de un granuloma de cuerpo extraño por los hilos de cat gut crómico.

En el modelo de axonotmesis de nervio ciático es necesario destacar que es un modelo simple que permite que exista poca variabilidad y error de técnica porque la lesión del músculo es mínima y el pinzamiento es total, este modelo es aplicado para estudiar aspectos de la regeneración nerviosa periférica y podría ser también útil para estudiar respuestas nociceptivas, pues se ajusta a una lesión de axonotmesis de grado I o grado II, en las cuales es posible que observar condiciones de regeneración y dolor, debido a que existe una preservación del endoneuro, de la lámina basal y de la microcirculación local, así la regeneración no sólo es posible sino que es espontánea. Por lo cual a pesar de que se generó una interrupción axonal – sináptica, la preservación de los componentes mencionados, permite un restablecimiento de la sensibilidad.

Este modelo animal de axonotmesis, tendría como ventajas el ser un modelo más simple, menos invasivo y traumático comparado al modelo de constricción crónica del nervio ciático, debido a que este mismo implica gran dificultad y mayor tiempo en el procedimiento de operación y de aprendizaje.

Conclusión

Las técnicas neuroquirúrgicas aplicadas constituyen una herramienta valiosa para la investigación de distintos aspectos relacionados del sistema nervioso como su regeneración, su respuesta nociceptiva y los cambios histopatológicos que se pueden trasladar a las patologías de la clínica.

Es importante la descripción detallada de los protocolos actualmente utilizados para así reducir la variabilidad de la aplicación de los mismos.

Referencias

1. Ramón y Cajal, S. *Estudios sobre la degeneración y regeneración del sistema nervioso*. vol. 2. Imprenta Hijos de Nicolás Moya, Madrid, 1914.
2. Almudena, Ramón Cueto. *Axonal Regeneration in Damaged Nervous System*. Ars Medica. Revista de Humanidades 2003; 2:239-249.
3. Ortega, A.; Roca, A.; Micó, J.A. *Animal models of pain. A critical view*. Rev Soc Esp Dolor. España, 2002; 9: 447-453.
4. Savastano, L.E.; Laurito S.R.; Fitt, M.; Rasmussen, J.; Gonzalez, V.; Patterson, S.L. *Sciatic nerve injury: A simple and subtle model for investigating many aspects of nervous system damage and recovery*. 2014. Journal of Neuroscience Methods 227 :166–180.
5. Seddon, H.J. *A classification of nerve injuries*. Br Med J 1942;2:237–9.
6. Seddon, H.J. *Three types of nerve injury*. Brain 1943;66:237–88.
7. Sunderland, S. *A classification of peripheral nerve injuries producing loss of function*. Brain 1951;74:491– 516.
8. Prieto, R.; Gutiérrez-González, R.; Pascual, J.M.; Roda, J.M.; Cerdán, S.; Matias-Guiu, J.; Barcia, J.A. *Modelos experimentales de traumatismo craneoencefálico*. Neurocirugía v.20 n.3 Murcia jun. 2009.
9. S.Y.M. Takeda a, L.S. de Oliveira a, L.L. Sobral aM.C. Somazzi b, M.I.L. Montebelo a,b, R.M. Teodori. *Regeneración nerviosa periférica en ratones expuestos a un ambiente enriquecido*. Rev Neurol 2008; 47:185 – 190.