

Estudio Comparativo entre Dos Intensidades de Ultrasonido Continuo en la Reparación del Nervio Espinal Lesionado por Compresión

Comparative Study between Two Intensities of Continuous Ultrasound in the Repair of the Spinal Nerve Injured by Compression

Emilio Farfán C.* & Fernando Matamala V.**

FARFÁN, E. & MATAMALA, V. F. Estudio comparativo entre dos intensidades de ultrasonido continuo en la reparación del nervio espinal lesionado por compresión. *Int. J. Morphol.*, 31(3):1124-1129, 2013.

RESUMEN: El ultrasonido continuo fundamenta su efectividad en la energía térmica que genera, favoreciendo la reparación nerviosa. Es por esto que surge la interrogante de que si al aplicar diferentes intensidades de ultrasonido continuo sobre el nervio espinal lesionado, la respuesta reparativa será igual o distinta. Para ello se utilizaron 12 ratas de sexo masculino a las que se les aisló quirúrgicamente el nervio isquiático, el cual fue pinzado durante 45 segundos con una fuerza constante de 40N. La compresión se realizó a 10mm sobre la bifurcación, luego se desinfectó y suturó. Inmediatamente después de la operación las ratas fueron agrupadas de a 3: A) control sano, B) control lesionado, C) aplicación de ultrasonido terapéutico de 0,5w/cm² y D) aplicación de ultrasonido terapéutico de 1w/cm². El grupo A se utilizó como control sano y no recibió irradiación. Las ratas del grupo B fueron lesionadas y no recibieron irradiación y las del grupo C y D fueron lesionadas e irradiadas transcutáneamente en la región correspondiente al recorrido del nervio isquiático utilizando intensidades de 0,5w/cm² y 1w/cm², 3 MHz de frecuencia, un cabezal de 0,5cm², durante 1 minuto y 10 días consecutivos. 28 días post operatorio se extrajeron los nervios isquiáticos y fueron sometidos a técnicas de tinción de H-E y Van Gieson. Se realizó el diagnóstico histopatológico y la morfometría: se midió el Grosor del Perineuro, Perímetro del núcleo del Schwannocito, Perímetro del Axón Mielínico y Perímetro de la Mielina. Los resultados revelan que el ultrasonido continuo es efectivo en la reparación del nervio espinal, siéndolo más con 1w/cm² que con 0,5w/cm².

PALABRAS CLAVE: UltrasonidoTerapeutico; Reparación; Nervio isquiático; Rata.

INTRODUCCIÓN

Wood & Loomis (1927) iniciaron una serie de investigaciones sobre los efectos biológicos y la utilización terapéutica de los ultrasonidos. Autores como Rodríguez (2004) y Martínez *et al.* (1998), afirmaron que el ultrasonido entrega energía térmica en forma directa sobre los tejidos provocando un aumento en el metabolismo local y de la lesión, en el caso que existiera, y contribuiría a la regeneración de ésta. Cowden & Abell (1963) observaron que el ultrasonido continuo a intensidades de 1w/cm² y 3w/cm² puede producir lesiones sobre algunos tejidos blandos, existiendo una relación directa entre la intensidad de la terapia y la severidad de la lesión, lo que es concordante con lo expresado por Kolios *et al.* (1999), quienes observaron que la posibilidad de lesión de un tejido aumenta con la capacidad de atenuación de éste, quedando en evidencia entonces el efecto térmico de la terapia. Respecto a su efecto sobre los tejidos

Chen *et al.* (2005), demostraron un aumento en la expresión de colágeno tipo I y III, siendo concordante con la proliferación de fibroblastos y su activación en la secreción del material extracelular preconizado por Schencke & del Sol (2010), o su efecto sobre el músculo esquelético, donde el ultrasonido es capaz de regenerar precozmente las fibras musculares lesionadas (Bassoli, 2001). En el caso del tejido nervioso Habash *et al.* (2006), y Monte-Raso *et al.* (2006), calificaron al nervio espinal como una de las estructuras más sensibles a la hipertermia, produciendo el ultrasonido efectos positivos en su protección y reparación.

Respecto a las compresiones nerviosas existen técnicas estandarizadas para realizarlas como las propuestas por Luís *et al.* (2007) o Mazzer *et al.* (2008), consistentes en la aplicación progresiva de cargas para evaluar la res-

* Departamento de Anatomía, Pontificia Universidad Católica de Chile, Santiago, Chile.

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

Proyecto Financiado por Dirección de Investigación de la Universidad de La Frontera, Proyectos DI-0052 y DI-0056.

puesta del nervio, ambos describen alteración de las capas conectivas y microfasciculaciones de las fibras nerviosas del tipo Neuropraxia y Axonotmesis (Seddon & Herbert, 1975), siendo dichos signos proporcionales a la carga aplicada y teniendo los schwannocitos un rol fundamental como moduladores del proceso de remielinización y reparación del tejido nervioso afirmado por Nieto-Sampedro *et al.* (2003), Rummler & Gupta (2004) y Chen *et al.* (2007).

El objetivo de esta investigación experimental fue aplicar diferentes intensidades de ultrasonido continuo sobre el nervio espinal lesionado con el fin de evaluar si la respuesta reparativa será igual o distinta.

MATERIAL Y MÉTODO

Se utilizaron 12 ratas macho de la cepa Sprague Dawley, peso promedio 250g, obtenidas del Bioterio de la Facultad de Medicina de la Universidad de la Frontera, Temuco, Chile; todas sanas y alimentadas con pellet e hidratación *ad libitum* en condiciones de ventilación y luminosidad apropiadas en jaulas individuales. Las ratas fueron anestesiadas con Ketamina (9 mg/100g) y Xilazina (1,25 mg/100g) y se procedió quirúrgicamente para exponer asépticamente el nervio isquiático derecho a través de una disección entre los músculos bíceps femoral y semimembranoso. Una vez ubicado el nervio, éste fue comprimido durante 45 segundos con una pinza construida para la experiencia, calibrada con una fuerza constante de 40N y aplicada 10mm sobre su bifurcación en nervios tibial y fibular común (Fig. 1). Luego, se suturaron los planos musculares y subcutáneos con seda 5/0 y realizó control antiséptico de la herida, dejando a los animales en sus jaulas aisladas. A las 24 horas, los animales fueron separados en grupos A) control sano, B) control lesionado, C) aplicación de ultrasonido terapéutico de 0,5w/cm² y D) aplicación de ultrasonido terapéutico de 1w/cm². El grupo A se utilizó como control sano y no recibió irradiación. Las ratas del grupo B fueron lesionadas y no recibieron irradiación y las ratas de los grupos C y D fueron lesionadas e irradiadas transcutáneamente en la región correspondiente al recorrido del nervio isquiático utilizando una intensidad de 0,5w/cm² (C) y 1w/cm² (D), respectivamente, con una frecuencia de 3 MHz y un cabezal de 0,5cm², durante 1 minuto por 10 días consecutivos para ambos grupos.

Luego de 28 días post operatorio, se extrajeron los nervios isquiáticos (Fig. 2) y se sometieron a técnicas histológicas de rutina con tinción de Hematoxilina-Eosina (HE) y Van Gieson (VG) (Prophet *et al.*, 1995). Se realizó el diagnóstico histopatológico y la morfometría (Mandarim-

de-Lacerda, 1995) con el software Carl-Zeiss, Axiolab y el software Leica Suite Image Analysis IM1000 y se midió el grosor del perineuro, perímetro del núcleo del schwannocito, perímetro del axón mielínico y perímetro de la mielina. Los resultados fueron estadísticamente analizados con el software Stata 10.



Fig. 1. Imagen que muestra el momento del pinzamiento del nervio isquiático de rata.

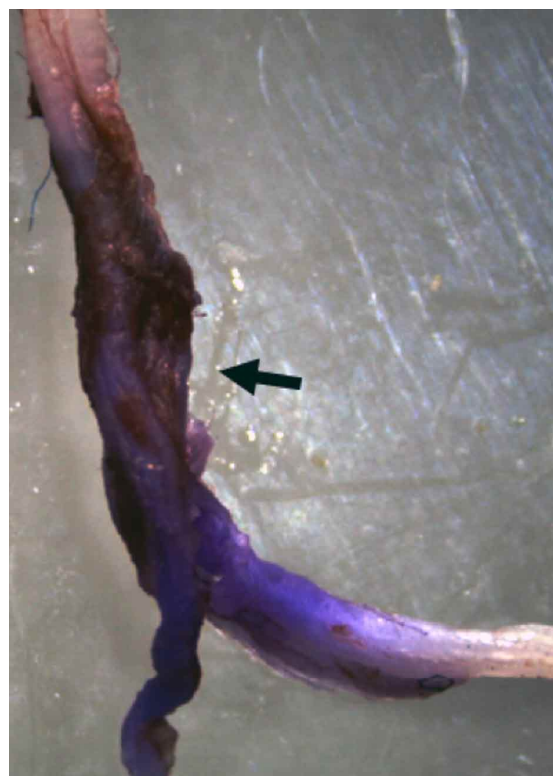


Fig. 2. Imagen que muestra el nervio isquiático de rata inmediatamente después de la extracción, se indica la zona de compresión con signos de inflamación.

RESULTADOS

Para el grupo A, en el corte longitudinal se observó el trayecto ondulante clásico de la fibra nerviosa, al corte transversal en las fibras nerviosas mielinicas fue posible observar el axón central intensamente teñido y una vaina envolvente escasamente teñida debido a que sus componentes habían sido disueltos en procesamiento del tejido. Se distinguen los núcleos ovalados de los schwannocitos adosados externamente con respecto a dichas vainas (Fig. 3). En el grupo B, se observó un fascículo de forma anormal, de márgenes irregulares, identificándose los núcleos de los schwannocitos núcleos de fibroblastos y células endoteliales. A diferencia del nervio control sano se aprecian focos dispersos y localizados de fibrosis endoneural. El grosor de la vaina es de tamaño variable observándose núcleos de schwannocitos reactivos levemente agrandados pero normalmente adosados en la periferia de dichas vainas, se destaca la

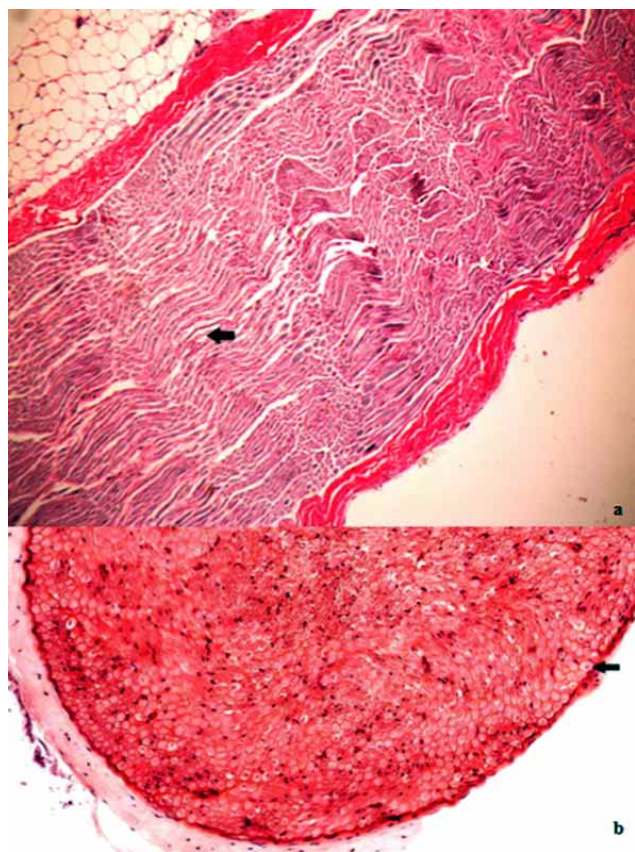


Fig. 3. a) Corte longitudinal de nervio control sano, se indica el patrón ondulatorio de la fibra nerviosa dentro del nervio (Van Gieson 100x). b) Corte transversal de un fascículo de nervio control sano, se indica el espacio que corresponde a la vaina de mielina y el axón en su interior (Van Gieson 400x).

desorganización de las fibras nerviosas (Fig. 4). En el grupo C, aplicación de ultrasonido $0,5\text{w/cm}^2$, en los cortes observados el perineuro forma una vaina tubular estructurando varias láminas fibro-celulares continuas y concéntricas de espesor variable, rodeado de tejido adiposo muy vascularizado. En estas mismas secciones con mayor aumento se pueden identificar los núcleos de los schwannocitos, matriz colágena y fibras mielinicas con artefacto de espina de pescado, axón mielinico hiper cromático en algunos campos con un notorio aumento en su grosor. De igual manera es posible observar fibras nerviosas amielinicas y fibras mielinicas reactivas con escaso desarrollo de la vaina. La hiperplasia fibroblástica es leve conservando la estructura propia de la fibra nerviosa reparativa, además se destaca el mayor ordenamiento de las fibras nerviosas dentro del fascículo

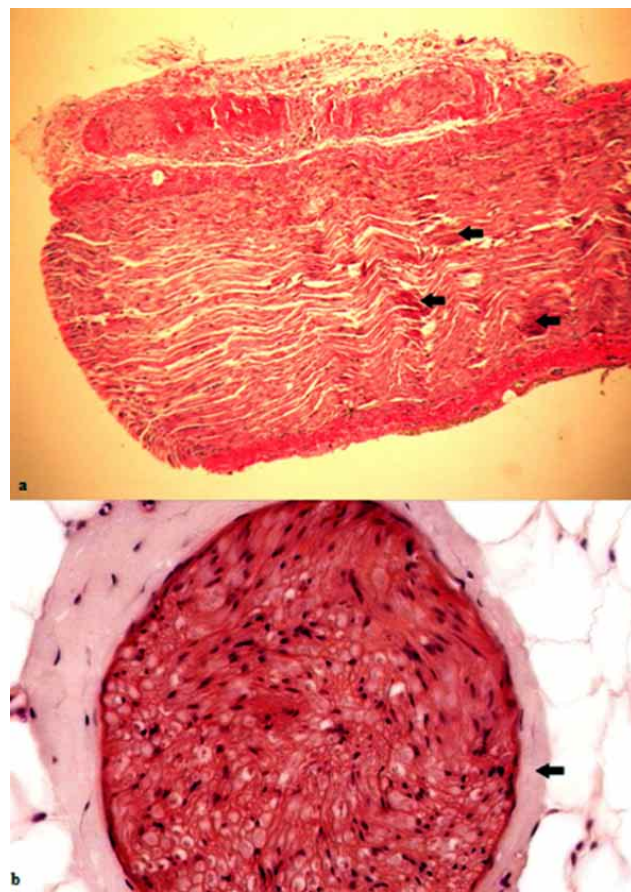


Fig. 4. a) Corte longitudinal de nervio control lesionado, se indican focos localizados de fibrosis (Van Gieson 100x). b) Corte transversal de nervio control lesionado, se indica epineuro rodeando al perineuro (Van Gieson 400x). Nótese la organización de las fibras nerviosas.

en comparación con el grupo anterior (Fig. 5). Para el grupo D, aplicación de ultrasonido 1 w/cm², en los cortes longitudinales se observó el patrón ondulatorio normal de la fibra nerviosa presentando los axones artefacto de espina de pescado. En estos mismos cortes y con aumento mayor se pueden identificar los núcleos de los schwannocitos con un marcado aumento de tamaño, una

matriz colágena muy marcada y haces de fibras gruesas con una proliferación de fibroblastos, en algunos campos de cortes transversales es posible observar neuroqueratina (artefacto de técnica). La hiperplasia fibroblástica es moderada conservándose la estructura propia de la fibra nerviosa reparativa. En este grupo se observa la mayor organización fibrilar (Fig. 6).

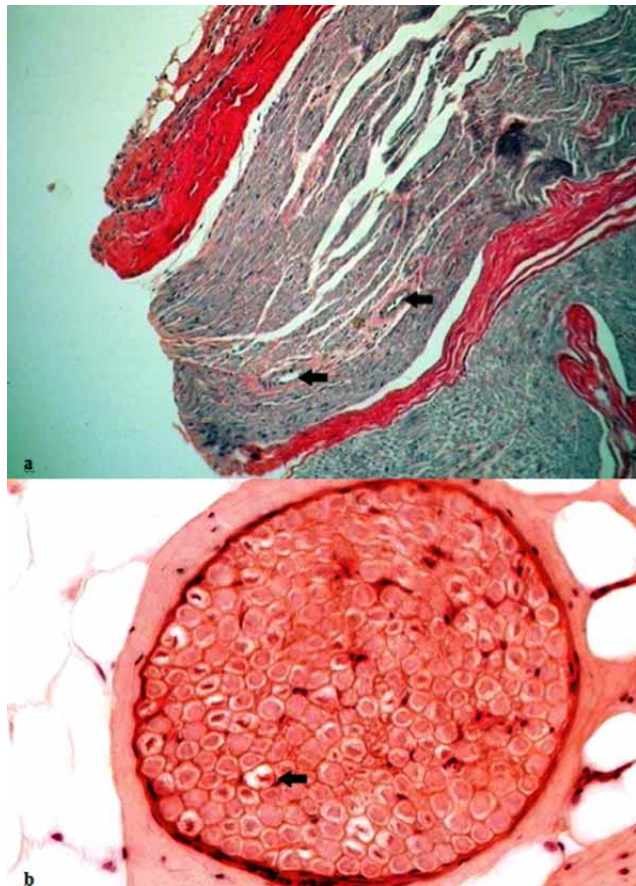


Fig. 5. a) Corte longitudinal de nervio irradiado con 0,5 w/cm², las flechas indican vasos sanguíneos intraneurales (Van Gieson 100x). b) Corte transversal de un fascículo de nervio irradiado con 0,5 w/cm², la flecha indica fibra nerviosa rodeada por un Schwannocito (Van Gieson 400x). Nótese la organización de las fibras nerviosas.

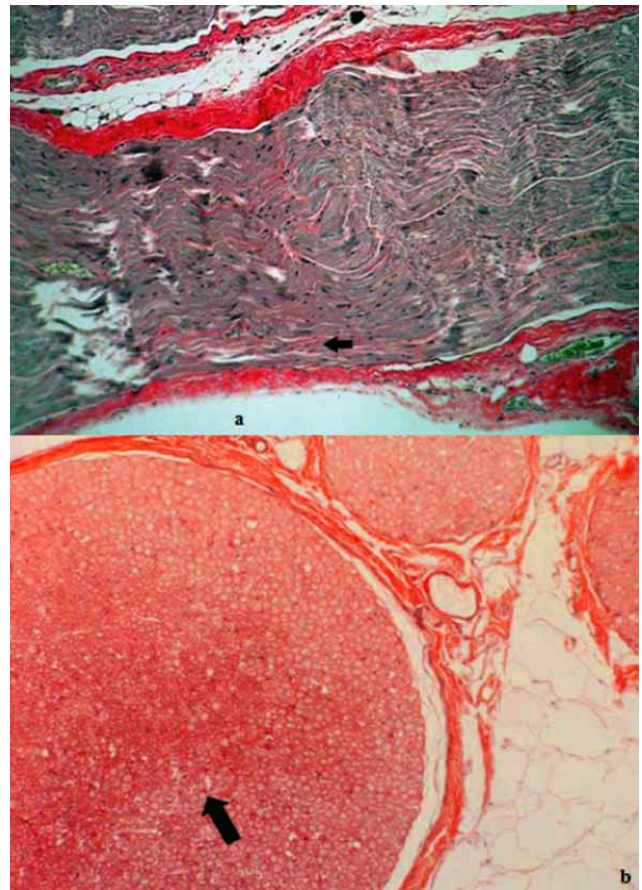


Fig. 6. a) Corte longitudinal de nervio irradiado con 1w/cm² se indica foco de fibrosis endoneurial. b) Corte transversal de nervio irradiado con 1w/cm² la flecha indica un foco de fibrosis endoneurial (Van Gieson 100x). Nótese la organización de las fibras nerviosas.

Tabla I. Resumen con promedios de las estructuras medidas en cada grupo.

Variables	A		B		C		D	
	Control		Control		US		US	
	Sano μ	DE (\pm)	Lesionado μ	DE (\pm)	0,5 w/cm ² (μ)	DE (\pm)	1 w/cm ² μ	DE (\pm)
Diámetro perineuro	13,42	1,19	11,58	0,63	13,06	0,76	13,35	0,75
Perímetro schwannocito	6,79	0,23	7,11	0,42	7,41	0,28	7,24	0,23
Perímetro axón	1,35	0,06	0,94	0,06	1,34	0,03	1,36	0,05
Perímetro mielina	0,63	0,045	0,53	0,04	0,70	0,05	0,71	0,04

DISCUSIÓN

Se aprecia que el perineuro crea una vaina tubular formada por varias láminas fibrocelulares continuas y concéntricas de espesor variable al igual que en un nervio sano. La hiperplasia fibroblástica conserva la estructura propia de la fibra nerviosa reparativa con deterioro leve de las capas conjuntivas siendo esto concordante con las descripciones de Luís *et al.* y Mazzer *et al.*

En los grupos C (0,5w/cm²) y D (1w/cm²) el perímetro del núcleo de los schwannocitos fue mayor que en el grupo B (control lesionado) que también fueron lesionados. Sin embargo, destaca el menor tamaño en el grupo A (control sano), esto se podría deber a la inexistencia del proceso de remielinización que si ocurrió en los nervios lesionados, el cual aumenta la actividad y volumen de los schwannocitos confirmando así lo sustentado por Nieto-Sampedro *et al.*, Rummler & Guptay Chen *et al.* (2007). Esto último ocurre en mayor medida en los grupos C y D debido probablemente a la aplicación del ultrasonido.

Además, se debe tener en consideración lo señalado por Chen *et al.* (2007), para quienes los schwannocitos son los responsables de guiar el crecimiento axonal, siendo uno

de los principales moduladores endógenos del proceso de remielinización, lo que pudo ser comprobado por las diferencias significativas en el perímetro axonal determinando en el grupo B (control lesionado) respecto a los grupos que recibieron irradiación (C y D). Estos resultados apoyan la idea que el nervio es una estructura altamente sensible a la temperatura (Habash *et al.*) y, que el calor generado por el ultrasonido es el responsable de acelerar la reparación del nervio isquiático de rata propuesta por Monte-Raso *et al.* De esta manera, existiría concordancia con los fundamentos terapéuticos del ultrasonido continuo como una terapia reparativa (Rodríguez, 2004; Martínez *et al.*).

Los resultados revelan que la irradiación con ultrasonido continuo del nervio isquiático de rata lesionado por compresión, en dosis diarias durante 10 días, produjo una mayor activación del proceso de remielinización en comparación con los nervios lesionados y no irradiados. Además de las 2 terapias utilizadas, la dosis de 1w/cm² fue la que más estimuló la reparación general del nervio espinal lesionado, permitiendo concluir que a mayor intensidad dentro del rango de 0,5 w/cm a 1 w/cm mayor será el efecto reparativo del nervio espinal lesionado.

FARFÁN, E. & MATAMALA, V. F. Comparative study between two intensities of continuous ultrasound in the repair of the spinal nerve injured by compression. *Int. J. Morphol.*, 31(3):1124-1129, 2013.

SUMMARY: The continuous ultrasound bases its efficiency on the heat energy it generates, favoring the nervous repair. Therefore, the question arises whether the reparative response will be equal or different under varying intensities of continuous ultrasound application on the disabled spinal nerve. For the study we used 12 male rats; the ischiatic nerve was surgically isolated and compressed during 45 seconds with a constant force of 40N. The compression was realized at 10 mm on the bifurcation, and was subsequently disinfected and sutured. Immediately following the operation the rats were separated in groups of 3: A) Healthy control, B) Injured control, C) Application of therapeutic ultrasound of 0.5 w/cm² and D) Application of therapeutic ultrasound of 1 w/cm². Group A was used as healthy control and did not receive irradiation. The rats in group B were injured and did not receive irradiation and those of groups C and D were injured and were transcutaneously irradiated in the area corresponding to the ischiatic nerve using intensities of 0.5 w/cm² and 1 w/cm², 3 MHz of frequency. We used a compress of 0.5 cm², during 1 minute and for 10 consecutive days. 28 days post operative ischiatic nerves were removed and submitted to technologies of H.E and VG stain. Histopathological and morphometrical diagnosis was realized: Thickness of the Perineurium, schwannocyte perimeter, Myelin Axon and Myelin perimeters were measured. The results revealed that the continuous ultrasound is effective in the repair of the spinal nerve, more so with 1 w/cm² than with 0.5 w/cm².

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

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Bassoli, D. *Avaliação dos efeitos do ultra-sompulsado de baixa intensidade na regeneração de músculos queléticos com vistas a aplicabilidade em clínica fisioterápica*. Tese grado de Mestre, Universidade de São Pablo, 2001.

Chen, H. C.; Tsai, W. C.; Tang, C. W. & Pang, J. H. S. Ultrasound stimulation of type I collagen and type III collagen expression of tendon cells. *AIP Conf. Proc.*, 754:272, 2005.

- Chen, Z. L.; Yu, W. M. & Strickland, S. Peripheral regeneration. *Annu. Rev. Neurosci.*, 30:209-33, 2007.
- Cowden, J. D. & Abell, M. Some effects of ultrasonic radiation on normal tissues. *Exp. Mol. Pathol.*, 40:367-83, 1963.
- Habash, R. W.; Bansal, R.; Krewski, D. & Alhafid, H. T. Thermal therapy, part 1: an introduction to thermal therapy. *Crit. Rev. Biomed. Eng.*, 34(6):459-89, 2006.
- Kolios, M. C.; Sherar, M. D. & Hunt, J. W. *Temperature dependent tissue properties and ultrasonic lesion formation*. Advances in Heat and Mass Transfer in Biotechnology, HTD Vol.363, BED – Vol.44:113-8, 1999.
- Luís, A. L.; Amado, S.; Geuna, S.; Rodrigues, J. M.; Simões, M. J.; Santos, J. D.; Fregnan, F.; Raimondo, S.; Veloso, A.; Ferreira, A. J.; Armada-da-Silva, P. A.; Varejão, A. S. & Maurício, A. C. Long-term functional and morphological assessment of a standardized rat sciatic nerve crush injury with a non-serrated clamp. *J. Neurosci. Methods*, 163(1):92-104, 2007.
- Mandarim-de-Lacerda, C. A. *Métodos cuantitativos em morfologia*. Eduerj, Universidade do Rio de Janeiro, Brasil, 1995.
- Martínez, M. M.; Pastor, J. M. & Sendra, F. *Manual de Medicina Física*. Madrid, Ed. Harcourt Bruce, 1998.
- Mazzer, P. Y.; Barbieri, C. H.; Mazzer, N. & Fazan, V. P. Morphologic and morphometric evaluation of experimental acute crush injuries of the sciatic nerve of rats. *J. Neurosci. Methods*, 173(2):249-58, 2008.
- Monte-Raso, V. V.; Barbieri, C. H.; Mazzer, N. & Fazan, V. P. S. Osefeitos do ultra-som terapéutico nas lesões por magamento do nervo ciático de ratos: análise funcional da marcha. *Rev. Bras. Fisioter.*, 10(1):113-9, 2006.
- Nieto-Sampedro, M.; Collazos-Castro, J. E.; Taylor, J. S.; Gudiño-Cabrera, G.; Verdú-Navarro, E.; Pascual-Piédrola, J. I. & Insausti-Serrano, R. Trauma en el sistema nervioso central y su reparación. *Rev. Neurol.*, 35(6):534-52, 2003.
- Prophet, E.; Mills, B.; Arrington, J. & Sobin, L. *Métodos Histotecnológicos*. Washington, Instituto de Patología de las Fuerzas Armadas de los Estados Unidos de América (AFIP), 1995.
- Rodríguez, J. *Electroterapia en Fisioterapia*. Madrid, Ed. Panamericana, 2004.
- Rummler, L. & Gupta, R. Peripheral nerve repair: a review. *Curr. Opin. Orthop.*, 15(4):215-9, 2004.
- Schencke, C. & del Sol, M. Cambios morfológicos en la regeneración del tendón calcáneo de rata (Sprague Dawley) por la aplicación de ultrasonido continuo. *Int. J. Morphol.*, 28(2):601-8, 2010.
- Seddon, I. & Herbert, J. *Surgical disorders of the peripheral nerves*. London, Churchill Livingstone, 1975.
- Wood, R. W. & Loomis, A. L. The physical and biological effects of high frequency sound waves of great intensity. *Phil. Mag.*, 4(22):417-36, 1927.

Dirección para Correspondencia:
M.Cs. Emilio Farfán Cabello
Facultad de Medicina
Pontificia Universidad Católica de Chile
Santiago
CHILE

Email: efarfan@med.puc.cl

Recibido: 04-01-2013
Aceptado: 22-07-2013