

# Estudio preliminar experimental en ratas: uso de plasma rico en plaquetas en el tratamiento de lesiones agudas de nervios periféricos

## Experimental preliminary study in rats: use of platelet rich plasma in the treatment of acute injuries of peripheral nerves



Sorrenti-Pírez, N.

Natalia SORRENTI-PÍREZ\*, Santiago FOSSATI-COLA\*, Gonzalo FOSSATI\*\*

### Resumen

**Antecedentes y Objetivos.** Si consideramos la importancia social y laboral que han adquirido las lesiones de los nervios periféricos por las graves y permanentes secuelas motoras, sensitivas y vegetativas a que dan lugar, cualquier esfuerzo terapéutico para mejorar los resultados de la reparación nerviosa representa un paso positivo dentro del abordaje general de esta afección. A pesar de realizar una sutura técnicamente perfecta, nunca se logra repoblar el segmento distal con la misma cantidad de axones. Esto hace que se busquen alternativas para potenciar la regeneración nerviosa. Dentro de las terapias emergentes, la utilización de plasma rico en plaquetas (PRP) tiene un efecto beneficioso en la reparación nerviosa. Hasta este momento los estudios se han centrado en la utilización del PRP dentro de injertos o tutores interpuestos entre los cabos y no se ha prestado atención a la aplicación del mismo en la sutura directa.

**Material y Métodos.** Estudiamos 8 ratas Wistar a las que se les seccionaron ambos nervios ciáticos; a una de las suturas se le aplicó PRP y el otro nervio suturado se tomó como caso control. En una segunda etapa realizamos la biopsia de ambos nervios a diferentes tiempos y fijamos con un fluoróforo lipofílico que tiñe las fibras regeneradas. Tomamos 2 grupos: a los 40 días y a los 60 días. Calculamos el índice de función del nervio ciático.

**Resultados.** Los nervios seccionados y tratados con PRP presentaron un adelanto en la recuperación de la función nerviosa medida por pruebas funcionales; confirmamos anatómicamente mediante el estudio histológico del nervio.

**Conclusiones.** Los resultados obtenidos en el estudio indican una estimulación del proceso fisiológico de reparación nerviosa usando PRP.

### Abstract

**Background and Objectives.** Considering the social and laboral importance acquired by peripheral nerve injuries and the serious and permanent motor, sensory and vegetative damage leading to sequels, any therapeutic effort to improve the results of nerve repair represents a positive step in the overall management of this condition. Although a technically perfect suture was made, we never achieved repopulate the distal segment with the same amount of axons. This makes seeking alternatives to enhance nerve regeneration. Among the emerging therapies, the use of platelet rich plasma (PRP) has a beneficial effect on nerve repair. Until now, studies have focused on the use of PRP in grafts or guardians interposed between the ends and have not paid attention in its application in direct suture.

**Methods.** We studied 8 Wistar rats with severed damage of both sciatic nerves: in one nerve suture was applied PRP and the other sutured nerve was taken as case control. In a second stage, both nerve biopsy was performed at different times and fixed with a lipophilic fluorophore which stains regenerated fibers. Controls were taken in 2 groups: 40 days and 60 days. Index sciatic nerve was calculated.

**Results.** The nerves treated with PRP presented a break through in the recovery of nerve function as measured by functional tests and confirmed by histological study of the nerve.

**Conclusions.** The results indicate a physiological process stimulating nerve repair using PRP.

**Palabras clave** Lesión Neural, Nervios Periféricos, Plasma rico en plaquetas, Factores de crecimiento, Recuperación funcional.

**Nivel de evidencia científica** 5 Investigación básica

**Recibido (esta versión)** 21 febrero/2016

**Aceptado** 3 abril/2016

**Key words** Neural injury, Peripheral nerves, Platelet rich plasma, Growth factors, Functional recovery.

**Level of evidence** 5 Bench Research

**Received (this version)** 21 february/2016

**Accepted** 3 april/2016

**Conflicto de intereses:** los autores declaran no tener ningún interés financiero relacionado con el contenido de este artículo.

\* Médico Residente.

\*\* Jefe del Servicio.

Servicio de Cirugía Plástica y Microcirugía, Hospital Pasteur, Montevideo, Uruguay.

Trabajo galardonado con el con el Tercer Premio del Concurso Internacional de Residentes de la FILACP, Cancún, (México), septiembre de 2014 y con el Primer Premio del Concurso de Residente del Cono Sur de la FILACP, Asunción, (Paraguay), septiembre de 2009.



## Introducción

Las lesiones de los nervios periféricos son muy frecuentes en nuestro medio y son las responsables de un gran número de secuelas, muchas veces permanentes y con un alto costo social, por lo que su tratamiento se convierte en un constante desafío. En los casos de lesiones de tipo neurotmesis, la ausencia de reinervación espontánea hace que la intervención quirúrgica sea imprescindible para lograr la restauración de las funciones perdidas por denervación. La técnica de elección para realizar la reparación nerviosa dependerá de la distancia entre ambos cabos nerviosos, pudiendo ir desde la neurorrafia directa sin tensión, a la interposición de un injerto nervioso o la colocación de un tutor tipo injerto venoso o tubo de silicona. Afortunadamente en la mayoría de los casos es posible realizar la neurorrafia directa mediante sutura epiperineural, lo que ofrece los mejores resultados funcionales y el menor tiempo de recuperación. El objetivo de la sutura epiperineural es la restauración del patrón de inervación original, ya que suturando cabo a cabo los fascículos, se reduce la posibilidad de escape o distorsión de los axones nacientes (1). Esto implica llevar a cabo una correcta alineación axial de los fascículos por aposición directa.

El principio de reparación quirúrgica de los nervios periféricos tras su sección fue establecido por Laugier (1864) y Hueter (1873), quienes sugirieron la sutura directa mediante puntos epineurales (1,2). A pesar de los avances tecnológicos y el gran desarrollo de las técnicas microquirúrgicas, como ya adelantamos, la recuperación funcional completa nunca es posible (1,3). El grado o nivel de éxito de la misma dependerá de varios factores, como la distancia entre el sitio de la lesión y el efector, el mecanismo lesional, el tiempo transcurrido entre la lesión y su reparación, la edad, la presencia de comorbilidades, y la técnica quirúrgica utilizada. Se sabe que la reparación de los tejidos requiere de una compleja interacción entre las células y los factores de la matriz extracelular, estos últimos son importantes para el proceso de regeneración nerviosa (4). En consecuencia, la terapia basada en ingeniería molecular y celular ha centrado toda la atención en las últimas décadas. Se han estudiado varias sustancias adyuvantes y factores de crecimiento con el fin de mejorar el proceso de reinervación. En este contexto, la terapia celular, utilizando plasma rico en plaquetas (PRP), permite promover la modulación del medio, estimulando la quimiotaxis y la activación de diferentes rutas metabólicas para el beneficio de la obtención de un actividad regenerativa temprana (2-4).

La aplicación de PRP en reparaciones nerviosas usando tutores puede optimizar la migración y proliferación de células que acelerarían el proceso de reparación nerviosa (3). El uso de PRP, además de su acción en la liberación de factores de crecimiento importantes en la reparación nerviosa, sirve como vehículo para factores que estimulan la proliferación exógena de células específicas

en el proceso de reinervación (2). La presencia local de factores de crecimiento liberados por los gránulos alfa de las plaquetas es importante para regular la proliferación, la migración y la diferenciación de diversas estirpes celulares que participan en el proceso de reparación nerviosa (3).

El PRP se utiliza en la actualidad por diversas áreas, como la Cirugía Oral y Maxilofacial, y es de gran interés en el campo de la Cirugía Plástica y de la Cirugía Ortopédica. Existen estudios experimentales que demuestran que la aplicación del PRP tiene un efecto neurotrófico y que estimula la proliferación de las células de Schwann y por tanto la mielinización, elementos importantes para la reparación de los nervios periféricos (5,6).

El PRP se define como un volumen de plasma autólogo con concentraciones de plaquetas por encima de los niveles fisiológicos. Los estudios sobre PRP datan de hace 30 años y desde entonces se han utilizado para promover la regeneración de los tejidos (2). Su acción se debe al aumento local en las concentraciones de varios factores de crecimiento y proteínas secretadas por ellas. Estas moléculas que se encuentran en los gránulos alfa y en el citoplasma, se liberan en el momento en el que las plaquetas se activan. Las moléculas que se liberan son proteínas como: el factor de crecimiento derivado de las plaquetas (PDGF), el beta transformador ( $\beta$ TGF), el factor de crecimiento vascular (VGF), el de los fibroblastos (FGF), y el factor de crecimiento epidérmico (EGF) (7-10).

El pronóstico de reinervación depende directamente del tiempo. Esto se debe a que el mantenimiento del trofismo del músculo es directamente dependiente de su inervación. Por esta razón si se puede acortar el tiempo de recuperación nerviosa en una lesión de tipo neurotmesis, el pronóstico final de reinervación sería mejor. Si evaluamos los beneficios ya conocidos en el proceso de cicatrización y reparación mediante el uso de PRP, podemos inferir que éste puede mejorar el proceso de reparación nerviosa tras la realización de una neurorrafia en pacientes con lesiones de tipo neurotmesis. Los beneficios del PRP que se explican para reparación nerviosa están descritos para la aplicación con injerto o tutores, no existiendo en la literatura analizada datos sobre su uso en los procedimientos de reparación mediante neurorrafia directa. Nuestra hipótesis de trabajo será evaluar los beneficios del PRP en la mejora de los tiempos de recuperación nerviosa. De confirmarse, podría ser una herramienta terapéutica útil para potenciar la recuperación nerviosa en lesiones agudas de nervios periféricos.

El objetivo general de este trabajo es por tanto demostrar que el PRP es un recurso útil para la reparación nerviosa en lesiones de tipo sección nerviosa que se reparan con sutura directa entre los cabos. Como objetivo específico nos planteamos demostrar histológicamente que la utilización del PRP aumenta la relación entre el número de fibras nerviosas regenerantes/tiempo de recuperación. Por otra parte, los mecanismos de regeneración

nerviosa en ambientes enriquecidos con factores de crecimiento son pocos conocidos *in vivo*, lo cual añade una faceta de investigación básica a este trabajo.

## Material y método

Llevamos a cabo la investigación en dos etapas. La primera etapa la realizamos en el Laboratorio de Microcirugía del Servicio de Cirugía Plástica del Hospital Pasteur (Montevideo, Uruguay), en colaboración con el Servicio de Laboratorio, Sección de Hematología, para la obtención del PRP, en el período comprendido entre enero y febrero de 2013. La segunda etapa la realizamos en el Departamento de Neurofisiología Celular y Molecular del Instituto de Investigaciones Biológicas “Clemente Estable” (Montevideo, Uruguay) en el periodo comprendido entre marzo y mayo también de 2013.

Se trata de un trabajo prospectivo, longitudinal y observacional, en el que estudiamos 8 ratas Wistar machos, adultas, de entre 300 y 400 gr. de peso, agrupadas en 2 grupos de 4 ratas cada uno.

Los animales fueron tratados de acuerdo a los estándares internacionales de manejo de animales de laboratorio y a las normas nacionales actualmente vigentes. El procedimiento fue aprobado por el Comité de Ética en el Uso de Animales de Laboratorio de la Facultad de Medicina.

**Etapla 1.** Realizamos prueba funcional de ambos nervios ciáticos de cada rata normal para medir los parámetros de índice de función (IFC) previos al acto quirúrgico. Practicamos disección de los nervios ciáticos de las ratas, reparación mediante sutura directa inmediata y aplicación del PRP.

Como protocolo aplicamos el PRP en el nervio ciático izquierdo, y como caso control realizamos la sutura nerviosa sin PRP en el nervio ciático derecho. Cabe destacar que en el caso control no utilizamos solución de plasma pobre en plaquetas debido a que existen estudios que confirman un efecto opuesto al obtenido con PRP, lo que podría falsear nuestros resultados (1).

**Etapla 2.** Procedimos a calcular el índice de función de ambos nervios ciáticos (IFC) mediante prueba de marcha De Medinaceli modificada (12-14). A continuación, abordamos los nervios ciáticos y realizamos la biopsia de éstos para estudio histológico. Fijamos los preparados de nervio ciático biopsiados por inmersión con paraformaldeído al 4% en buffer fosfato y luego se les aplicó 1.1', dioctadecyl 1-3.3.3'.3'-tetramethyl carbocyanine perchlorate (DiI, Invitrogen) en el cabo proximal. Es importante aclarar que el DiI es un fluoróforo que sirve como marcador lipofílico con espectro de emisión en color rojo. Las muestras se incubaron a 37° C. A los 15 días realizamos cortes histológicos finos, de 15 micras, unos en el plano trasversal y otros en el longitudinal, utilizando un criostato y posterior visualización en un microscopio con focal (Olympus® FV300). Evaluamos cualitativamente el perfil de los axones que cruzaban la lesión y cuantificamos los mismos.

Cabe destacar que dividimos los animales de estudio en 2 grupos:

- Grupo 1 (4 ratas): en las que realizamos el paso 2 a los 40 días.
- Grupo 2 (4 ratas): en las que realizamos el paso 2 a los 60 días

### Etapla 1. Procesamiento del PRP y aplicación del mismo. Disección de los nervios ciáticos. Sección de los nervios ciáticos y sutura nerviosa

#### Índice Funcional del Nervio Ciático mediante prueba de marcha (IFC) (Fig. 1)

Antes de comenzar con el procedimiento quirúrgico, realizamos la prueba de marcha para evaluar el índice de función del nervio ciático en cada animal y en cada nervio ciático. Éste se obtuvo por el análisis de las huellas de las patas traseras de la rata de acuerdo con el método De Medinaceli, si bien nosotros realizaremos una modificación del mismo usando tinta negra como tintura y un corredor con papel absorbente. En esta primera etapa tomamos sólo las medidas iniciales, calculando en la segunda etapa el grado de disfunción mediante el IFC.

El mismo consiste en:

1. Se pintan las patas traseras con tinta negra y la rata se coloca de pie sobre una plataforma de madera (43 x 10 cm) que contiene tiras de papel blanco absorbente. Esta pasarela está cerrada por un lado y proporciona un refugio para la rata al final de la misma.
2. Las tiras de papel contienen las huellas del animal. Tomamos las siguientes medidas para cada pata trasera:
  - a) Longitud total de la huella (LP): desde el talón al dedo más largo, que por convención, es el tercer dedo.
  - b) Apertura total de los dedos de los pies (DT): se mide la distancia transversal entre el primer y el quinto dedo.

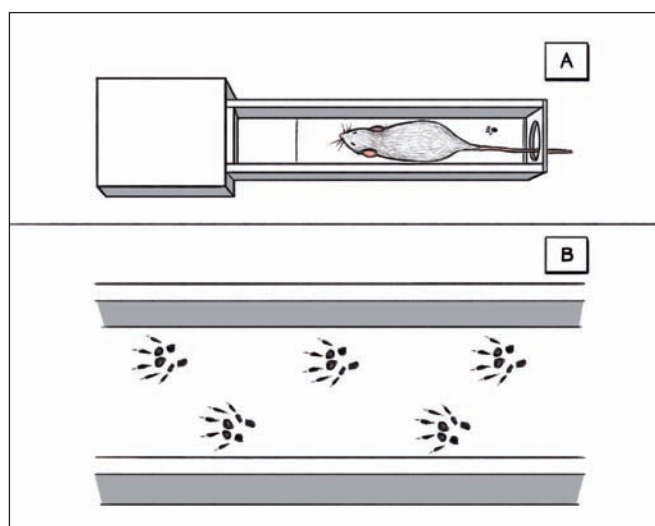


Fig. 1. Índice de función del nervio ciático (IFC) por prueba de marcha.

- c) Apertura de los dedos medios (DM): distancia transversal entre el segundo y el cuarto dedos.

**Obtención de sangre y procesamiento del PRP**

Los animales fueron anestesiados por vía intraperitoneal con ketamina (80mg/Kg.) y xilazina (8 mg/kg). Realizamos un abordaje abierto de la arteria carótida primitiva y la cateterizamos utilizando un abbotat 24G previo clampado de la misma a nivel proximal y distal. Liberamos el cabo proximal y procedimos a la toma de sangre utilizando una jeringa de 1 cc., extrayendo un total de 1 ml de sangre. Luego de la toma, procedimos rápidamente a la colocación de la misma en un tubo con citrato de sodio al 2.4% (anticoagulante) y lo mezclamos mediante suaves movimientos del tubo para evitar la activación plaquetaria. Una vez obtenida la muestra sanguínea, procedimos a la obtención del PRP mediante centrifugación (Centrifuge® Modelo 5702 Eppendorf) (Fig. 2).

Existen diferentes protocolos para la obtención del concentrado plaquetario de acuerdo a cada sistema e incluso a cada autor. Así, algunos presentan 2 centrifugados, otros simplemente 1, y existe una amplia variación en cuanto a los tiempos de centrifugado. Nosotros utilizamos un protocolo calculado de 1.300 rpm en 8 minutos (Fig. 3).



Fig. 2. Colocación de la muestra en la centrifugadora.



Fig. 3. Protocolo de centrifugación: 1.300 rpm durante 8 minutos.

Cuando se centrifuga la sangre anticoagulada se forman 3 capas en función de la densidad: la capa inferior compuesta por glóbulos rojos; la capa media compuesta por glóbulos blancos y plaquetas, y la capa superior compuesta por plasma. La fase plasmática, a su vez, puede subdividirse en 3 fracciones en función de la cantidad de plaquetas presentes, que de superior a inferior son: una fracción pobre en plaquetas, la fracción intermedia con una concentración media de plaquetas, y la fracción rica en plaquetas (PRP). Aspiramos el PRP mediante micropipeta (Fig. 4 y 5) (En la figura 5 se esquematiza todo el procedimiento de obtención de la sangre y el procesamiento del PRP).

**Procedimiento quirúrgico**

Preparamos en todos los animales mediante rasurado la superficie lateral de ambos muslos. Expusimos ambos nervios ciáticos mediante una incisión póstero-lateral y longitudinal, orientada desde el trocánter mayor al cóndilo lateral del fémur, seguida de una disección roma entre los músculos extensores. Disecamos el nervio mediante técnica microquirúrgica atraumática, utilizando un microscopio quirúrgico con aumento de 40x para manejar el nervio ciático durante cada paso del procedimiento quirúrgico. Una vez abordado el nervio ciático, realizamos la sección neta del mismo proximal a sus ramas (a 10 mm de su origen por debajo del trocánter) (Fig.6).

Posteriormente realizamos la sutura directa epiperineural con nylon monofilamento 10-0 (código 2850) con 2 puntos cardinales en las comisuras, según nuestro protocolo. Finalizadas las neurorrafias, aplicamos el PRP activado en el nervio ciático izquierdo. Suturamos la piel de ambos abordajes con nylon monofilamento 5-0 (Fig. 7).

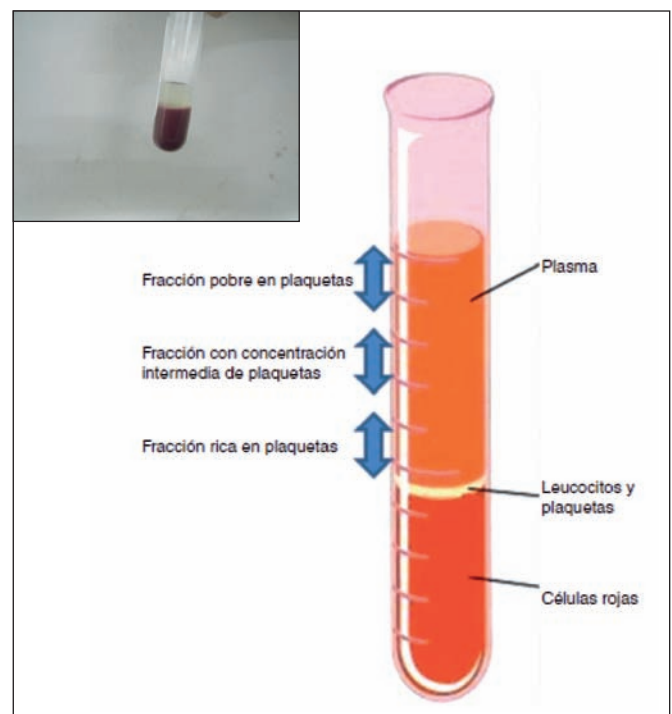


Fig. 4. Estratos de densidad.

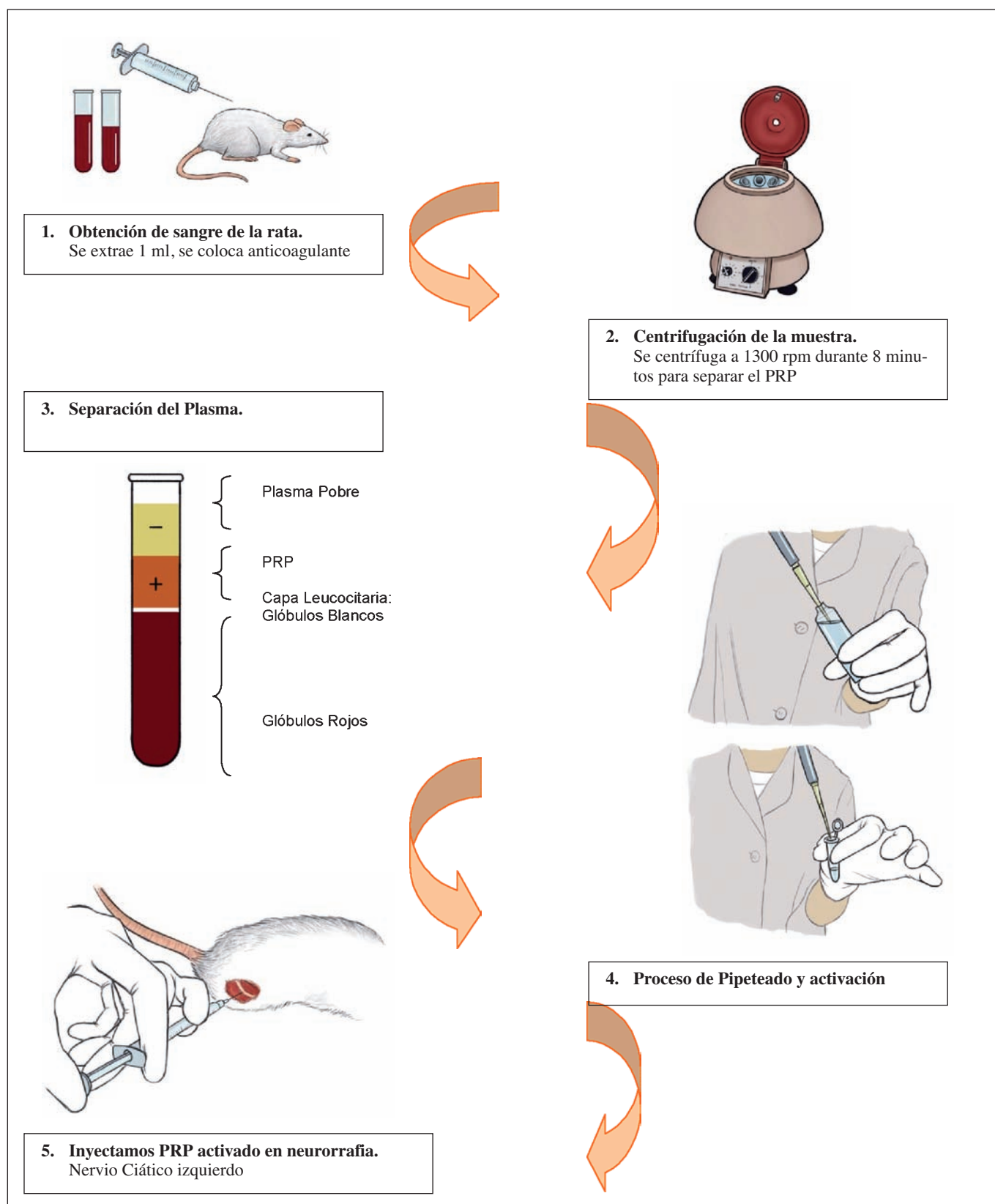


Fig. 5. Etapa 1. Procesamiento del PRP y aplicación.

### Activación y aplicación del PRP

Activamos el PRP mezclándolo con cloruro de calcio al 10% a razón de 0.10 ml de ClCa por ml de plasma obtenido con micropipeta. El tiempo de activación del PRP osciló entre los 5 y los 10 minutos. Propusimos que la mezcla del PRP y la solución activadora se realizara *in situ* sobre la neurografía. La activación se produjo al mez-

clarse ambas soluciones inmediatamente antes de dispensarlas sobre la lesión, es decir, las plaquetas ya se aplicaron activadas. Esta activación produce agregación y degranulación plaquetaria, liberándose las proteínas con factores de crecimiento contenidas en los gránulos alfa (Fig. 8 y 9).



Fig. 6. Discección del nervio ciático. Sección a 10 mm por debajo del trocánter.



Fig. 8. Toma de CIGa con micropipeta.

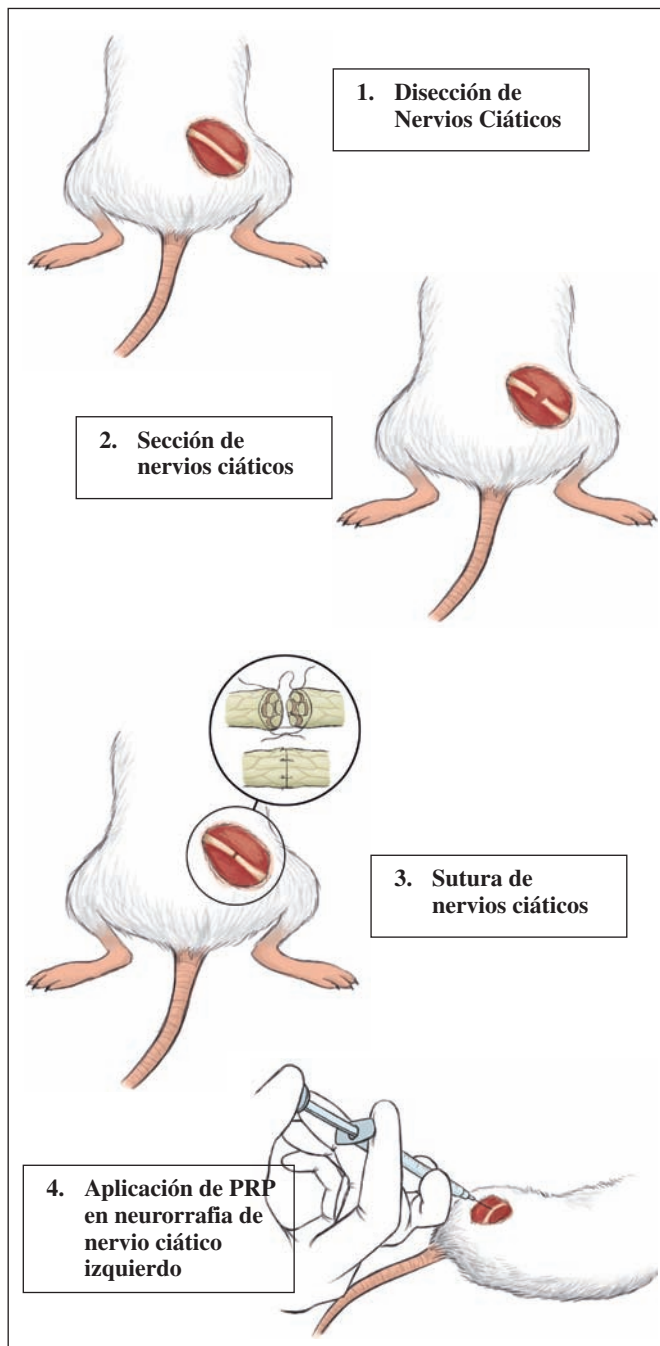


Fig. 7. Etapa 1. Discección de nervios ciáticos, sección, y sutura inmediata.



Fig. 9. Aplicación de CIGa al PRP (activación).

## Etapa 2. Cálculo del IFC. Estudio Histológico

### Cálculo del IFC (Fig. 1)

Tomando los valores normales (N) previos a la cirugía y los valores después de la cirugía (C), calculamos el IFC, recordando que LP es longitud máxima de la pata, DT es la distancia transversal mayor, y DM es la distancia transversal media de la pata. La fórmula utilizada en los cálculos de la CFI fue propuesto por Bain<sup>(13)</sup> como sigue:

$$IFC = \frac{-38.3 \times \frac{CLP - NLP}{NLP} + 109.5 \times \frac{CDT - NDT}{NDT} + 13.3 \times \frac{CDM - NDM}{NDM} - 8.8}{}$$

Inicialmente los animales no se apoyaban en la pata operada y se presentaban con caída del pie y dedo en aducción completa a consecuencia de una grave disfunción del nervio ciático. Poco a poco fueron recuperando la capacidad de apoyo del miembro operado y la extensión de los dedos.

### Análisis histológico del nervio con PRP y sin PRP

Visualizamos los cortes de los nervios con los fluro-rófos y posteriormente visualizamos con microscopio confocal. El procedimiento realizado se detalla a continuación:

1. Abordaje de ambos nervios ciáticos.
2. Fijación *in situ* por inmersión con paraformaldehído al 4% en buffer fosfato.
3. Retirada de los nervios ciáticos, marcaje del cabo distal con hilo de sutura y mantenimiento en fijación con la misma solución de paraformaldehído durante 24 horas.
4. Aplicación de DiI en el cabo proximal.
5. Incubación en estufa a 37° C durante 15 días
6. Cortes de 15 micras de espesor en el plano transversal con criostato vibratorio. Evaluación de los cortes a dos alturas estandarizadas: la primera inmediatamente en la neurorrafia, y la segunda a 500 micras distal a la primera.

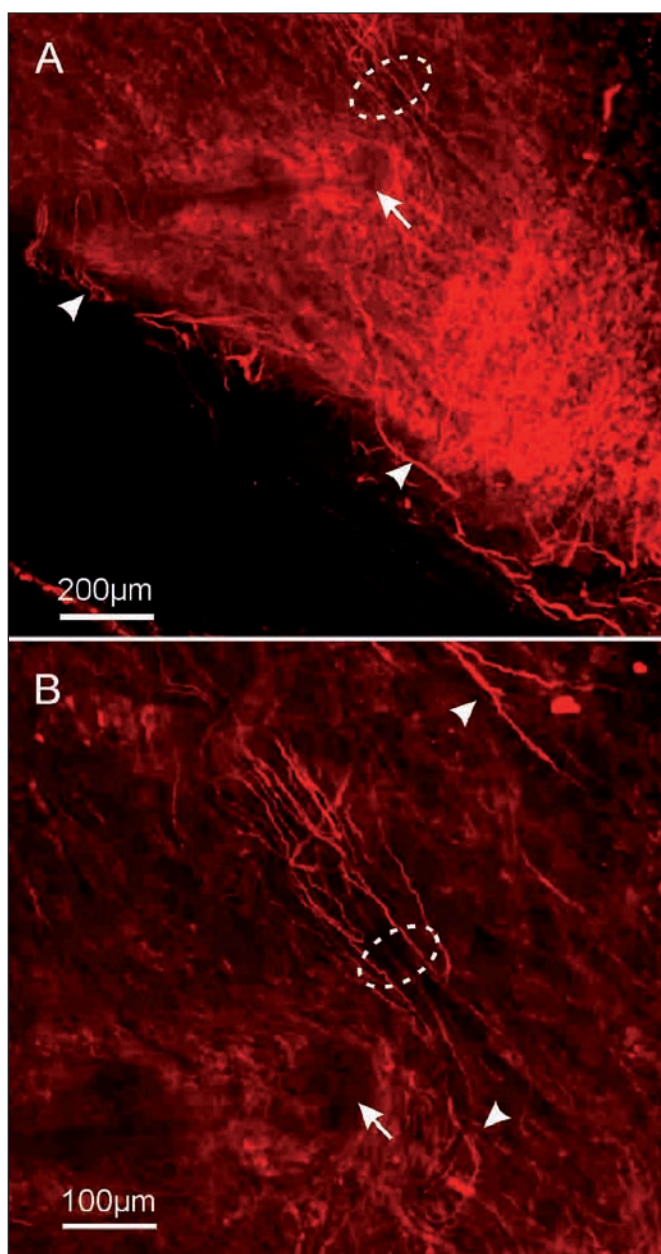


Fig. 10. Cortes histológicos longitudinales teñidos con DiI A: corte oblicuo de un nervio ciático seccionado, suturado y tratado con PRP. Este panel muestra un grupo de axones finos (rodeados por la elipse) cruzando el nivel de la sutura (uno de los puntos de la misma está señalado por una flecha). También se pueden ver otros axones de mayor calibre transitando muy cerca del perineuro (puntas de flecha). Material teñido con el fluoróforo lipofílico DiI que emite en rojo. Sección óptica obtenida con un microscopio confocal. B: muestra la misma región a mayor aumento.

7. Visualización con microscopio confocal.

Separamos 2 grupos de acuerdo al tiempo de regeneración: grupo 1 (4 ratas) en el que realizamos el estudio histológico a los 40 días; y grupo 2 (4 ratas) en el que lo hicimos a los 60 días (Fig. 10 y 11).

## RESULTADOS

Dividimos los datos analizados de la siguiente manera:

- 1) La recuperación funcional, basándonos en el cálculo de índice de función del nervio ciático por el test de marcha.
- 2) El estudio de los cortes histológicos.

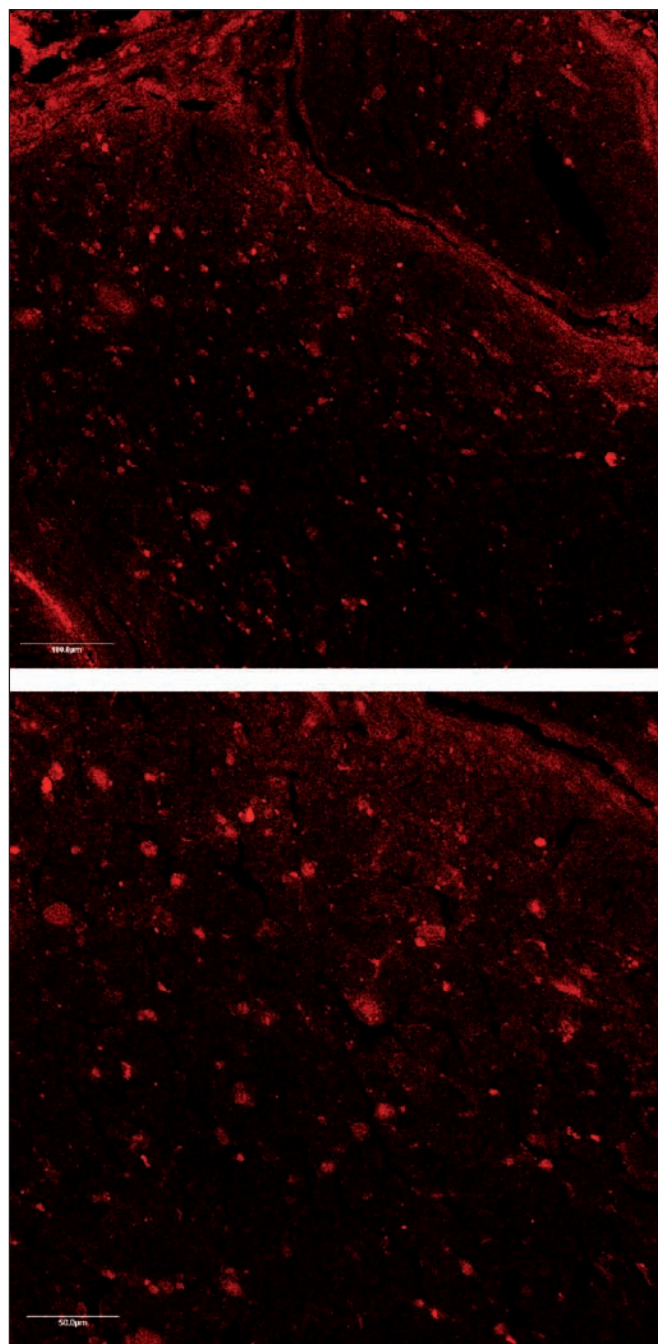


Fig. 11. Cortes histológicos transversales para recuento axonal. A: corte transversal de un nervio ciático seccionado, suturado y tratado con PRP. Material teñido con el fluoróforo lipofílico DiI que emite en rojo. Sección óptica obtenida con un microscopio confocal. En esta imagen se pueden observar los grupos de axones finos distales a la sutura nerviosa a los 40 días (uno de ellos está señalado por una flecha).

### 1) Resultados del cálculo del Índice de Función del nervio ciático (IFC)

Los datos de IFC calculados según la formula son los siguientes:

$$IFC = -38.3 \times \frac{CLP - NLP}{NLP} + 109.5 \times \frac{CDT - NDT}{NDT} + 13.3 \times \frac{CDM - NDM}{NDM} - 8.8$$

En la interpretación de los valores, aquellos negativos cerca de cien (-100) indicarán una disfunción severa del nervio y los negativos cerca de cero (0) serán interpretados como función normal o disfunción leve (Tabla I).

De los resultados en el cálculo del IFC tenemos que tanto a los 40 como a los 60 días existe una recuperación clínica parcial según el cálculo de IFC. Esta mejoría es francamente mayor en los casos en lo que aplicamos PRP en comparación con los casos control. A los 40 días la media del IFC fue de -43.58 en comparación con el caso sin PRP en el que fue de -62.86.

A los 60 días observamos una mejoría tanto en los tratados con PRP como en los casos control; pero en los primeros existía una mejoría estadísticamente significativa, siendo el cálculo de la media de IFC = -27.01 en los casos tratados con PRP en comparación a -47.62 en los casos control.

Si analizamos los resultados en cuanto a recuperación funcional del ciático en el periodo entre los 40 y 60 días, la función nerviosa mejoro en ese periodo un 17% en los tratados con PRP y un 15% en los no tratados. Esto permite afirmar que los beneficios del PRP en cuanto a mejora en los tiempos de recuperación nerviosa se evidencian en los primeros días, y que tras esta etapa, las velocidades de crecimiento son similares.

En la Grafica 1 agrupamos las ratas biopsiadas a los 40 días y comparamos las tratadas con PRP con las no tratadas con PRP.

En la Gráfica 3 realizamos el mismo análisis con las ratas biopsiadas a los 60 días. Vemos que en ambos grupos, las tratadas con PRP tienen una mejoría en términos de recuperación clínica en comparación con los casos control.

Tabla I. Cálculo de IFC

Rata	PRP +	PRP -	Días
1	-38,31	-64,75	40
2	-48,53	-69,09	40
3	-43,24	-56,60	40
4	-44,24	-61,01	40
5	-25,39	-48,69	60
6	-26,15	-50,82	60
7	-27,32	-43,69	60
8	-29,20	-47,27	60

Gráfica 1. Índice de función del ciático a los 40 días



Gráfica 2. Media del Índice de función del ciático a los 40 días



Gráfica 3. Índice de función del ciático a los 60 días

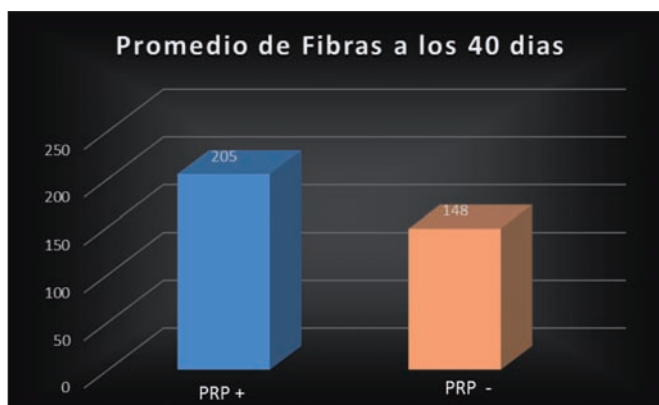


Gráfica 4. Media del índice de función del ciático a los 60 días

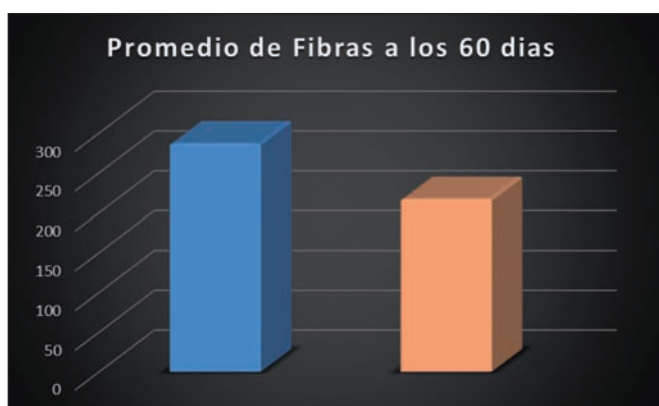




Gráfica 5. Sitio de evaluación. Promedio de fibras a los 40 días



Gráfica 6. Sitio de evaluación. Promedio de fibras a los 60 días



En las Gráficas 2 y 4 analizamos las medias a los 40 y 60 días respectivamente de los nervios tratados con PRP y los casos control.

## 2) Resultado de los cortes histológicos con DiI

Realizamos los estudios histológicos a 2 niveles: uno a nivel de la neurorrafia y otro 500 micras distal a la misma. Cuantificamos las fibras y calculamos valores promedios de fibras a los 40 y 60 días, comparando los casos tratados con PRP con los casos control sin PRP. Como mencionamos anteriormente, la tinción con DiI colorea las fibras regeneradas (Fig. 10 y 11).

Al realizar el recuento axonal en cada caso en los preparados histológicos, evidenciamos que a los 40 días los nervios tratados con PRP tenían 205 axones regenerantes, en comparación con 148 en los no tratados con PRP. A los 60 días, los tratados con PRP tenían 287 fibras regenerantes y los casos control sin PRP tenían 217. Estos datos evidencian que el promedio de fibras es mayor en los casos tratados con PRP que en los casos control, tanto a los 40 como a los 60 días (Gráficas 5 y 6).

## Discusión

Cuando se realiza una neurorrafia directa, el objetivo principal es la restauración del patrón de inervación original reduciendo la posibilidad de escape o distorsión de

los axones nacientes (1). La regeneración funcional después de una sección nerviosa es un proceso complejo que depende de factores centrales, locales y periféricos. Numerosos factores influyen en la regeneración de los nervios periféricos y contribuyen al éxito o al fracaso de la reparación. Los mecanismos básicos del control de la mielinización de las fibras regeneradoras están parcialmente determinados, pero continúan siendo poco conocidos los procesos del crecimiento y orientación de las fibras. Cabe destacar que a pesar de los avances en las técnicas de reparación microquirúrgicas, nunca es posible la restitución *ad integrum* en la función nerviosa después de una sección del mismo (1,3). Es por eso que se buscan terapias emergentes que estimulen o aceleren el proceso de reparación, como podría ser la utilización de PRP.

La bioestimulación con factores de crecimiento autógenos es la parte fundamental de la propuesta del presente trabajo. La cicatrización de los tejidos es un intrincado proceso en el cual intervienen no solo los factores plaquetarios proangiogénicos, sino también factores antiangiogénicos (15). Ya en publicaciones previas se han vistos los efectos beneficiosos de la terapia con PRP para diferentes tejidos, como en quemaduras (16), cierre de úlceras (17,18), incluso asociándolos a técnicas quirúrgicas de lipoinjerto para disminuir el proceso inflamatorio y la reabsorción de los injertos (19). De hecho, el empleo de PRP en procesos terapéuticos relacionados con la Cirugía Plástica y Reparadora es una realidad de uso frecuente en diferentes centros hospitalarios del mundo (17).

Existen estudios experimentales que demuestran que la aplicación del PRP tiene un efecto neurotrófico, y estimula la proliferación de las células de Schwann, y por tanto la mielinización, elementos importantes para la reparación de los nervios periféricos (5,6). Estos estudios permiten reafirmar los excelentes resultados que obtuvimos en nuestro trabajo en cuanto a los beneficios de la mejora en la recuperación funcional del nervio ciático en los casos tratados con PRP. Si bien en los puntos de cortes que tomamos a los 40 y 60 días existe una recuperación clínica parcial en todos los casos según el cálculo de IFC, la recuperación es francamente mayor en los casos en los que aplicamos PRP, siendo los datos estadísticamente significativos.

En cuanto a la correlación histológica de los mismos, en todos los casos de neurorrafias tratadas con PRP, los cortes transversales mostraron un recuento axonal mayor con diferencias comparadas a los casos control (PRP negativos), que también mostraron diferencias estadísticamente significativas. Por lo que coincidimos con estudios previos sobre los beneficios de utilizar tutores enriquecidos con factores de crecimiento y PRP en la recuperación nerviosa, estimulando así la acción de los axones regenerantes (6,11).

## Conclusiones

Podemos concluir que el PRP aplicado sobre lesiones traumáticas de nervios periféricos con reparación primaria mediante neurorrafia directa mejora los tiempos de recuperación nerviosa evidenciados clínicamente mediante el índice de función del nervio ciático, y anatómicamente mediante el recuento de fibras regenerantes que atraviesan la sutura a diferentes tiempos de ocasionada la injuria. Este estudio experimental abre el campo para futuros estudios clínicos a fin de evaluar con posterioridad su aplicación en humanos.

La confirmación de nuestra hipótesis nos permite ampliar el campo de este trabajo de investigación buscando conocer mejor las bases anatómicas y funcionales de esta mejor recuperación utilizando PRP, proyectándose a una aproximación multitécnica que abarque la exploración inmunohistoquímica de las moléculas en juego, el análisis ultraestructural de los cabos nerviosos seccionados, y estudios electrofisiológicos que indiquen el restablecimiento en la conducción neural al igual que la velocidad de la misma.

## Agradecimientos

Agradecemos la colaboración prestada por el Servicio de Laboratorio, sección Hematología, del Hospital Pasteur para la obtención del PRP. También al Departamento de Neurofisiología Celular y Molecular del Instituto de Investigaciones Biológicas "Clemente Estable" que nos brindó apoyo para realizar el estudio histológico de las muestras. Asimismo, al Licenciado Alfonso Rosso, diseñador industrial e ilustrador, por realizar el diseño personal de los dibujos y esquemas de este trabajo.

## Dirección del autor

Dra. Natalia Sorrenti Pérez  
Hospital Pasteur  
Servicio de Cirugía Plástica y Microcirugía  
Larravide s/n esq. Cabrera  
Código postal 11400  
Montevideo, Uruguay  
natisorrenti@hotmail.com

## Bibliografía

1. **Braga Da Silva J., De Paula S., Pedroso M., Dalbem A. et al.** Thetherapeutic potential of stem cells for nervous system disease - Scientia Medica, Porto Alegre: PUCRS, v. 15, n. 4, out./dez. 2005.
2. **Sebben AD., Lichtenfels M., Braga da Silva J.F.** Regeneração de nervos periféricos: terapia celular e fatores neurotróficos. *Rev Bras Ortop.* 2011;46(6):643-649.
3. **Marques Colomé L.** Efeito do plasma rico em plaquetas e da eritropoietina na regeneração do nervo ciático de ratas Wistar. Tesis de Doctorado, Porto Alegre 2012.
4. **Baes CVW, Braga-Silva J, Machado DC, et al.** Avaliação neurofisiológica do efeito das células-tronco mesenquimais de medula óssea e do plasma rico em plaqueta na regeneração de nervo periférico.- Laboratório de Neurociências/Laboratório de Pneumologia-Instituto de Pesquisas Biomédicas Serviço de Cirurgia da Mão e Microcirurgia Reconstructiva/ Hospital São Lucas PUCRS.
5. **Braga Silva J, Gehlen D, Javier ARR, et al.** Efeitos das células-tronco adultas de medula óssea e do plasma rico em plaquetas na regeneração e recuperação funcional nervosa em um modelo de defeito agudo em nervo periférico em rato. *Acta Ortop Bras.* 2006;14(5):273-275.
6. **Elgazzar RF, Mutabagani MA, Abdelaal SE, et al.** Platelet rich plasma may enhance peripheral nerve regeneration after cyanoacrylate reanastomosis: a controlled blind study on rats. *Int J Oral Maxillofac Surg.* 2008;37(8):748-755.
7. **Reyes M., Montero S., Cifuentes J. et al.** Extraction Technique and Surgical Use of the Plasma Rich in Growth Factors (P.R.G.F.) Update. *Revista Dental de Chile* 2002; 93 (2): 25-28.
8. **Weiwei Li, Mitsuhiro Enomoto, Madoka Ukegawa, et al.** Subcutaneous Injections of Platelet-Rich Plasma into Skin Flaps Modulate Proangiogenic Gene Expression and Improve Survival Rates. *Plast. Reconstr. Surg.* 2012, 129: 858-861.
9. **Carrillo-Mora P., González-Villalva A., Macías-Hernández S.I., et al.** Plasma rico en plaquetas. Herramienta versátil de la medicina regenerativa? *Cir* 2013;81:74-82.
10. **Eppey B.L., Woodell J.E., Higgins J.** Platelet Quantification and Growth Factor Analysis from Platelet-Rich Plasma: Implications for Wound Healing Platelet Quantification and Growth Factor Analysis from Platelet-Rich Plasma: Implications for Wound Healing. *Plast. Reconstr. Surg.* 2004, 114: 1502-1507.
11. **Braga-Silva J., Gehlen D, Roman J.A., Menta C., et al.** Bone marrow stem cells and platelet-rich Plasma effects on nervous regeneration and Functional recovery in an acute defect Model of rats' peripheral nerve. *Acta Ortop Bras* 2006, 14(5): 273-275.
12. **De Medinaceli, L.** An index of the functional condition of rat sciatic nerve based on measurement made from walking tracks. *Exp Neurol* 1982, 77:634-643.
13. **Vilela Monte-Raso V., Henrique Barbieri C., Mazzer N.** Índice funcional do ciático nas lesões por Esmagamento do nervo ciático de ratos. Avaliação da reprodutibilidade do método entre examinadores. *Acta Ortop Bras* 2006, 14(3): 133-136.
14. **Braga Silva J., Leví Tres G., Lichtenfels M., et al.** Efeito do Plasma Rico em Plaquetas e de Plaquetas Ricas em Fibrina na regeneração de lesões com perda de substância do nervo ciático em ratos – Avaliação funcional através do Teste de Marcha. XII Salão de Iniciação Científica – PUCRS, 03 a 07 de outubro de 2011.
15. **Mateo de Acosta Andino, D.A. et al.** Actualización bibliográfica sobre el uso de preparaciones ricas en plaquetas en la cicatrización de heridas. *Cir plást iberolatinoam.*, 2010,36 (3): 231-238.
16. **Rossani, G. et al.** Tratamiento de quemaduras mediante plasma rico en plaquetas (PRP): parte I. *Cir plást iberolatinoam.*, 2014 (40) 2: 229-238.
17. **Monclús, E et al.** Nuestra experiencia en el tratamiento de úlceras crónicas mediante PRF- Viostat. Serie de 10 casos. *Cir plást Iberolatinoam*, 2009, 35 (2): 141-148.
18. **Montón Echeverría, J., Pérez Redondo, S. and Gómez Bajo, G. J.** Experiencia clínica en el empleo de factores de crecimiento autólogos obtenidos de plasma rico en plaquetas. *Cir plást iberolatinoam.*, 2007,33 (3): 155-162.
19. **Jarrah, A., Paloma, V. and Vernetta, O.** Reconstrucción mamaria mediante lipoinfiltrado enriquecido con PRP. *Cir plást iberolatinoam.*, 2013,39 (Suppl.1): s65-s73.