

Comportamiento de fibras nerviosas en crecimiento ante implantes corneales

The behaviour of growing nerve fibers in the presence of corneal implants

GIL HERNÁNDEZ MA¹, DÍAZ-FLÓREZ FEO L², GUTIÉRREZ GARCÍA R³

RESUMEN:

Objetivo: Investigar el comportamiento de las fibras nerviosas en crecimiento ante los diferentes componentes corneales.

Material y Método: Modelo experimental en ratas (n° = 30) consistente en crear un espacio cameral con el epi-perineuro del muñón proximal del nervio ciático seccionado, en cuyo extremo distal se introduce un fragmento corneal. Se realizan dos series (n° = 10 para cada una), según la córnea fuese o no desepitelizada previamente. Como serie control (n° = 10) se deja libre el extremo distal epi-perineural.

Resultados: En las dos series experimentales y en la control se observa crecimiento de fibras nerviosas, desde el muñón del nervio ciático, las cuales recorren el espacio cameral epi-perineural. En las dos series experimentales observamos penetración y crecimiento de fibras nerviosas a través del estroma corneal. En la serie en que se preservó el epitelio corneal, éste crece además de forma independiente del estroma, utiliza como sustrato los componentes nerviosos en crecimiento y da origen a quistes de inclusión epitelial.

Conclusiones: El conectivo del estroma corneal, con o sin epitelio puede ser inervado por fibras nerviosas "no" corneales en crecimiento. El epitelio corneal activado puede tener capacidad de inducir y guiar, independientemente del estroma, a las fibras nerviosas las cuales, a su vez, le sirven como soporte en la formación de quistes de inclusión.

Palabras clave: córnea, epi-perineuro, crecimiento nervioso.

SUMMARY:

Objective: To research the behavior of growing nerve fibers faced with different corneal implants.

Departamento de Anatomía Patológica de la Facultad de Medicina de la Universidad de La Laguna.

¹ Licenciada en Medicina y Cirugía.

² Catedrático de Anatomía Patológica y Decano de la Facultad de Medicina de La Laguna.

³ Profesor Titular de Histología.

Correspondencia:

M.^a Antonia Gil Hernández.

Angel Romero, 7 - 4.º n.º 4.

38009 Santa Cruz de Tenerife.

Material and Methods: Experimental model in rats ($n^{\circ} = 30$) consisting of creating a chamber space with the epi-perineurium of the proximal stump of the sectioned sciatic nerve, by introducing a corneal fragment into the distal end. Two series are undertaken ($n^{\circ} = 10$ for each one), according to whether the corneal epithelium has been removed beforehand or not. As a control series ($n^{\circ} = 10$) the distal epi-perineurial end was left free.

Results: In both the experimental series and in the control series, the growth of the nerve fibers was observed, from the stump of the sciatic nerve, throughout the epi-perineurial chamber space. In both the experimental series, we observed a penetration and growth of the nerve fibers through the corneal stroma. In the series where the corneal epithelium had been preserved, the latter also grows independently of the stroma and uses the growing nerve components as a substratum, giving rise to epithelial inclusion cysts.

Conclusions: The corneal stroma connective, with or without epithelium, may be innervated by growing "non" corneal nerve fibers. The activated corneal epithelium may, independently of the stroma, be able to induce and guide the nerve fibers which, in turn, serve it as a base for the formation of inclusion cyst.

Key words: cornea, epi-perineurium, nerve growth.

INTRODUCCIÓN

Los estudios destinados a conocer los mecanismos desencadenados durante la regeneración nerviosa mediante cambios en la interacción de los diferentes componentes corneales con las estructuras que los inervan, se han fundado en modelos experimentales que producen alteración "in situ" de la continuidad nerviosa o bien de la epitelial, así como de la epitelial y diferentes capas subepiteliales de la córnea (1-5). El objetivo de este trabajo es desarrollar un modelo experimental en el que la córnea es implantada ectópicamente en un espacio receptor de fibras nerviosas no corneales estimuladas al crecimiento. Mediante ello se pretende investigar el comportamiento de las fibras nerviosas "no" corneales en crecimiento ante los diferentes componentes que constituyen la córnea, fundamentalmente para precisar si tienen capacidad reinervante y/o de ser modificadas en su trayecto por dichos componentes.

MATERIAL Y MÉTODO

Para la realización de este estudio hemos utilizado un total de 30 ratas albinas "Sprague Dawley" de ambos sexos. Todas ellas fueron sometidas a una intervención consis-

tente en localizar el nervio ciático, sección del mismo, retracción de su cubierta epi-perineural, nueva sección de los fascículos nerviosos desprovistos de epi-perineuro y posterior extensión de éste último, creando una cámara o trayecto tubular en área distal a los fascículos nerviosos seccionados. (esquema 1)

Diez ratas fueron utilizadas como serie control, en la que se realizó lo previamente expuesto. En otras diez ratas (serie 1) se abocó en el extremo distal de la cámara epi-perineural un fragmento autólogo de córnea, conservando su epitelio. En la serie 2, se realizó igual procedimiento pero el segmento corneal fue desprovisto de epitelio (mediante aplicación de alcohol) antes de su implante.

El sacrificio de los animales se realizó a los 30 días de iniciada la experiencia. Realizando estudio con microscopía óptica y electrónica de las muestras obtenidas, mediante procedimiento convencional, en cortes semifinos y ultrafinos.

RESULTADOS

En la serie control se observa la presencia de un neonervio que sigue el recorrido del epi-perineuro. En su trayecto, se ponen de manifiesto fibras nerviosas mielínicas y amielínicas que, no sólo aparecen en el espa-

cio delimitado por las cubiertas epi-perineurales, sino que se introducen en éstas últimas, siguiendo un recorrido relativamente largo por las mismas.

Las fibras nerviosas en crecimiento aparecen rodeadas por células de Schwann, junto con vasos sanguíneos y algunos elementos macrofágicos y miofibroblásticos.

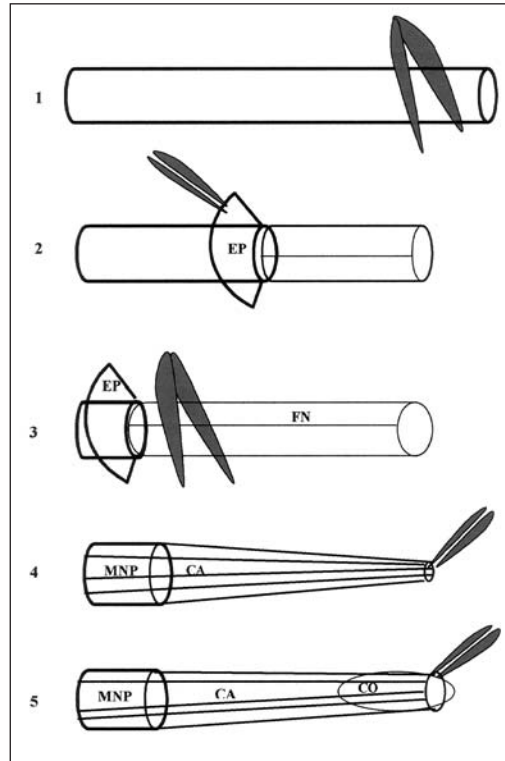
En la serie I, se evidencia similar crecimiento nervioso, a lo largo de la cámara epi-perineural, que en la serie control. En las zonas donde el estroma corneal queda directamente expuesto a las fibras nerviosas en crecimiento, sin interponerse el epitelio o la membrana de Descemet, es decir donde se seccionó o fragmentó la córnea implantada, se observan proyecciones nerviosas de tipo mielínico y amielínico penetrando y recorriendo dicho estroma. Las fibras nerviosas se acompañan de estructuras vasculares y de elementos de aspecto endoneural. El epitelio corneal experimenta también crecimiento a partir de los bordes laterales de sección de la primitiva córnea. Dicho crecimiento se efectúa de manera que se crea una cavidad quística delimitada por el epitelio preexistente y el neoformado (quiste de inclusión epitelial). (Figs. 1 y 2)

En la serie 2 al igual que en la control y en la serie 1, se observa crecimiento de componentes nerviosos desde el muñón proximal del nervio ciático. Las fibras nerviosas en crecimiento aparecen en contacto con amplias áreas corneales desprovistas de epitelio, con elevada tasa de penetración y recorren el mismo.

DISCUSIÓN

En la serie control pudimos confirmar las observaciones de otros autores (6-7) demostrando que el muñón nervioso del nervio ciático es capaz de crecer en un espacio delimitado por cámara epi-perineural aunque no haya muñón distal. Consideramos que el propio perineuro "per se" puede influir en el crecimiento nervioso, al establecerse la capacidad de las células perineurales de producir proteínas específicas de membrana basal, laminina y colágeno tipo IV (8-10), siendo

estas sustancias potentes inductores del crecimiento axonal. Por todo ello, condicionan un medio ambiente adecuado para el crecimiento de las fibras nerviosas y favorecen el



Esquema 1: Podemos apreciar los sucesivos pasos que se realizan para crear en el nervio ciático una cámara tubular a partir del epiperineuro, quedando abocada a la misma el muñón proximal del nervio. Figuras 1-4: 1=Sección del nervio, 2=Retracción del epiperineuro (EP), 3= Sección de los fascículos nerviosos (FN) desprovistos de epiperineuro, 4=Extensión de nuevo del epiperineuro creando la cámara tubular (CA).

Figura 5: corresponde a los casos en que se implanta un fragmento corneal (CO) en el extremo distal de la cámara epi-perineural.

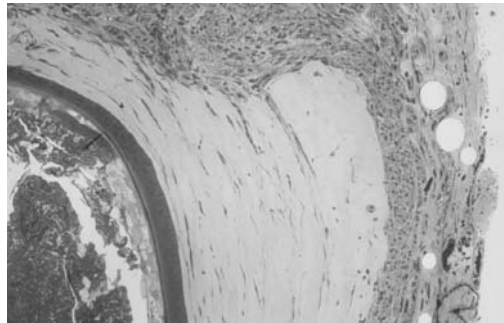


Fig. 1: Corte histológico donde se aprecia el quiste epitelial y las fibras nerviosas en crecimiento, mielínicas y amielínicas, en el estroma corneal.

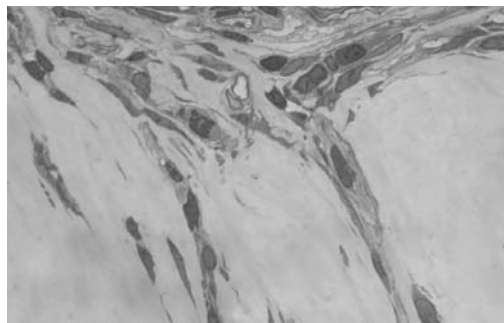


Fig. 2: Imagen a mayor aumento en la que se distingue con nitidez distintas fibras nerviosas que penetrando en el estroma corneal se acompañan de estructuras vasculares y elementos de aspecto endoneural.

desarrollo de un neonervio. A la formación de este microambiente también contribuyen otros promotores neurales, factores neurotróficos y quimiotácticos, liberados por parte del propio cabo nervioso proximal.

En las series experimentales cuando la córnea es implantada en el espacio epi-perineural se demuestra que ésta conserva su capacidad vital e incluso la regenerativa del epitelio, ya que se nutre por imbibición desde los tejidos periféricos. Ello determina que, cuando se implanta la córnea "sin" dañar el epitelio ni el estroma (serie 1), el epitelio tienda a crecer periféricamente, se repliegue sobre sí mismo y origine una formación quística, de tal manera que toda la superficie externa del epitelio (la primitiva y la del neoformado) se orienta hacia la luz de dicho quiste. Opinamos que dicho crecimiento epitelial tiene igual finalidad histogenética que los fenómenos de regeneración en las superficies en que el epitelio es erosionado, produciéndose crecimiento lateral hasta revestir toda el área de tejido conectivo.

Dado que, las fibras nerviosas alcanzan la córnea, y penetran su estroma, aún en ausencia del epitelio, se desprende que el estroma "per se" puede inducir el crecimiento nervioso. No obstante, es posible que las células de Schwann presentes en las fibras nerviosas preexistentes en el propio estroma corneal liberen factores de crecimiento que estimulen la penetración de nuevas prolongaciones. A este respecto es conocido que las células de Schwann secretan: a) Factor de crecimiento nervioso, comprobado in vitro (11) e in vivo (12); b) Factor promotor de neuritas, ligado a la laminina de la membrana basal de la célula de Schwann, que es considerado como un efectivo inductor de crecimiento axonal (13), y c) Proteínas ácido específicas, que pasan al espacio extracelular (14). Mediante estas sustancias, las células de Schwann tienen la capacidad de promover la regeneración nerviosa entre cabos seccionados (15).

Un hecho que nos ha llamado la atención es que el conectivo del propio nervio en crecimiento sirve de sustrato al epitelio que crece libre de estroma corneal. Esto último refuerza las hipótesis de la interacción neu-

rona-epitelio (16) que mantiene que el epitelio corneal en crecimiento libera factores que estimulan la reinervación nerviosa. Así, el epitelio puede influir en su propia innervación mediante la secreción de determinados factores que estimulan la función regeneradora de las neuronas (vía transporte axonal retrógrado), siendo por tanto una guía direccional para los axones. Posteriormente, la interacción mediante el contacto directo entre los axones en crecimiento y las células epiteliales puede determinar el patrón nervioso final y su densidad.

CONCLUSIONES

Se confirma que cámaras perineurales conectadas al muñón proximal del nervio ciático de la rata inducen el crecimiento de fibras nerviosas que recorren toda la longitud del espacio cameral. Aportamos un modelo experimental original en el que se introduce un fragmento de córnea en el extremo distal de la cámara previamente descrita, evidenciando la conservación de las propiedades vitales de la misma. En estas condiciones se produce penetración de las fibras nerviosas mielínicas y amielínicas en el estroma corneal, recorriéndole entre sus haces de colágena y láminas estromales. La presencia o ausencia de epitelio corneal "no" influye en dicha penetración.

Si hay epitelio corneal se detecta crecimiento de éste último y la formación de quistes de inclusión epitelial, sirviendo el propio conectivo nervioso como sustrato del epitelio. Por lo tanto, el propio epitelio corneal activado puede tener capacidad de inducir y guiar el crecimiento de las fibras nerviosas.

BIBLIOGRAFÍA

1. Rozsa A.J., Guss R.B., and Beurman R.W.: "Neural remodeling following experimental surgery of the rabbit cornea". *Invest. Ophthalmol Vis Sci.* 1983; 24: 1033-1051.
2. Tervo T., Vannas A., Tervo K., and Holden B.A.: "Histochemical evidence of limited reinnervation of human corneal grafts". *Acta Ophthalmol.* 1985; 63:207.

3. Chan-Ling T., Tervo K., Tervo T., Vannas A., Holden B.A., and Eranko L.: "Long term neural regeneration in rabbit following 180° limbal incision". *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 1987; 28:2083-2088.
4. Margreet de Leeuw and Chan K.Y.: "Corneal nerve regeneration, correlation between morphology and restoration of sensitivity". *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 1989; 30: 1980-1990.
5. Chan K.Y., Jarvelainem M., Chang J.H. and Edenfield M.J.: "A cryodamage model for studying corneal nerve regeneration". *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 1990;31: 2008-2021.
6. Evora P.: "Estudio experimental de la capacidad regenerativa de los muñones proximal y distal en nervios seccionados". Tesis doctoral Universidad de La Laguna. Facultad de Medicina, 1994.
7. Guimera F.J.: "El epi-perineuro en la regeneración del nervio periférico. Estudio experimental": Tesis doctoral Universidad de La Laguna. Facultad de Medicina, 1995.
8. Bignami A., Chi N.H., and Dhal: "Laminin in rat sciatic nerve undergoing wallerian degeneration: immunofluorescence study with laminin and neurofilament antisera". *J. Neurol.* 1984; 43:94.
9. Peltonen J., Jaak Kola S., Virtanen I., and Pellinen L.: "Perineural cell in culture. An immunocytochemical and electron microscopic study". *Lab. Invest.* 1987; 57:480-488.
10. Salonen V. et al: "Quantification of schwann cells and endoneural fibroblast-like cells after experimental nerve trauma". *Acta Neuropathol.* Berlin 1988; 75: 331-336.
11. Assouline J.G., Bosch P., Lin R., Kim I.A., Jensen R., and Patzis N.J.: "Rat astrocytes and Schwann cells in culture synthesize nerve growth factor-like neurite promoting factor". *Dev. Brain Res.* 1987;31:103.
12. Brown M.C., Perry V.H., Lunn E.R., Gordon S., Heumann R.: "Macrophage dependence of peripheral sensory nerve regeneration: possible involvement of nerve growth factor". *Neuron* 1991; 6:359-370.
13. Kauppila T., et al.: "A laminin graft replaces neurotography in the restorative surgery of the rat sciatic nerve". *Exp. Neurol.* 1993; 123: 181-191.
14. Skene J.H.P.: "Growth-associated proteins and the curious dichotomies of nerve regeneration". *Cell.* 1984; 37: 697-700.
15. Kerns J.M., Danielsen N., Holmquist B., Kante M., and Lundborg G.: "The influence of degeneration and regeneration through peripheral nerve grafts in the rats". *Exp. Neurol.* 1993; 122: 28-36.
16. Chan K.Y.: "Release of neurotrophic factor from rabbit corneal epithelium during wound healing and nerve regeneration". *Exp. Eye Res.* 1987; 45:633.