



Universitat Autònoma de Barcelona

ADVERTIMENT. L'accés als continguts d'aquesta tesi queda condicionat a l'acceptació de les condicions d'ús establertes per la següent llicència Creative Commons:  http://cat.creativecommons.org/?page_id=184

ADVERTENCIA. El acceso a los contenidos de esta tesis queda condicionado a la aceptación de las condiciones de uso establecidas por la siguiente licencia Creative Commons:  <http://es.creativecommons.org/blog/licencias/>

WARNING. The access to the contents of this doctoral thesis it is limited to the acceptance of the use conditions set by the following Creative Commons license:  <https://creativecommons.org/licenses/?lang=en>

MICROANATOMIA COMPARADA DEL NERVI CIÀTIC I VALIDACIÓ D'UN NOU BIOMARCADOR EN INJECCIONS INTRANEURALS



Universitat Autònoma
de Barcelona

Tesi Doctoral

RD 99 / 2011

Tesi presentada per **Anna Server Salvà** per optar al

Títol de Doctora

Directors

Dr. Miguel Ángel Reina Perticone
Dra. Ángeles Mesas Idáñez
Dra. Cristina Aguilera Martin

Tutor

Dr. Manuel Armengol Carrasco

Programa de Doctorat de Cirurgia i Ciències Morfològiques

Barcelona 2019

AUTORITZACIÓ DEL DIRECTOR DE LA TESI DOCTORAL

El Dr. Miguel Ángel Reina Perticone, professor agregat de la Facultad de Medicina Universidad CEU San Pablo (Madrid).

CERTIFICA:

Que la tesi que porta per títol “**Anatomia comparada del nervi ciàtic i validació d’un nou biomarcador en injeccions intraneurals**”, presentada per optar al grau de Doctora en Medicina, ha estat realitzada sota la meva direcció. Un cop finalitzada, autoritzo la seva presentació per ser jutjada pel tribunal corresponent.

I per tal que en quedi constància, firmo la present a Barcelona, Febrer de 2019.



Dr. Miguel Ángel Reina Perticone

AUTORITZACIÓ DE LA DIRECTORA DE LA TESI DOCTORAL

La Dra. Ángeles Mesas Idáñez, facultativa especialista en Anestesiologia, Reanimació i Terapèutica del Dolor de l'Hospital Universitari Vall d'Hebron.

CERTIFICA:

Que la tesi que porta per títol "**Anatomia comparada del nervi ciàtic i validació d'un nou biomarcador en injeccions intraneurals**", presentada per optar al grau de Doctora en Medicina, ha estat realitzada sota la meva direcció. Un cop finalitzada, autoritzo la seva presentació per ser jutjada pel tribunal corresponent.

I per tal que en quedi constància, firmo la present a Barcelona, Febrer de 2019.



Dra. Ángeles Mesas Idáñez

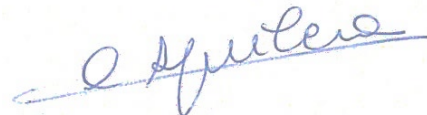
AUTORITZACIÓ DE LA DIRECTORA DE LA TESI DOCTORAL

La Dra. Cristina Aguilera Martin, associada mèdica laboral del Departament de Farmacologia, de Terapèutica i de Toxicologia de la Universitat Autònoma de Barcelona.

CERTIFICA:

Que la tesi que porta per títol "**Anatomia comparada del nervi ciàtic i validació d'un nou biomarcador en injeccions intraneurals**", presentada per optar al grau de Doctora en Medicina, ha estat realitzada sota la meva direcció. Un cop finalitzada, autoritzo la seva presentació per ser jutjada pel tribunal corresponent.

I per tal que en quedi constància, firmo la present a Barcelona, Febrer de 2019.



Dr. Cristina Aguilera Martin

AUTORIZACIÓ DEL TUTOR DE LA TESIS DOCTORAL

El Dr. Manuel Armengol Carrasco, catedràtic de la Universitat Autònoma de Barcelona.

CERTIFICA:

Que la tesi que porta per títol "**Anatomia comparada del nervi ciàtic i validació d'un nou biomarcador en injeccions intraneurals**", presentada per optar al grau de Doctora en Medicina, ha estat realitzada sota la meva direcció. Un cop finalitzada, autoritzo la seva presentació per ser jutjada pel tribunal corresponent.

I per tal que en quedi constància, firmo la present a Barcelona, Febrer de 2019.



Dr. Manuel Armengol Carrasco

Més lluny, heu d'anar més lluny
dels arbres caiguts que ara us empresonen,
i quan els haureu guanyat tingueu ben present no aturar-vos.
Més lluny, sempre aneu més lluny,
més lluny de l'avui que ara us encadena.
I quan sereu deslliurats torneu a començar els nous passos.
Més lluny, sempre molt més lluny,
més lluny del demà que ara ja s'acosta.
I quan creïeu que arribeu, sapigueu trobar noves sendes.

Viatge a Ítaca – **Lluís Llach**

<i>Agraïments</i>	<i>XV</i>
<i>Relació de taules, figures i fotografies</i>	<i>XVII</i>
<i>Índex d'abreviatures</i>	<i>XIX</i>
<i>Resum</i>	<i>XXI</i>
1. INTRODUCCIÓ	27
1.1 SISTEMA NERVIÓS PERIFÈRIC	29
1.1.1 Estructura dels nervis perifèrics	29
1.1.2 Histologia del nervi perifèric	30
1.1.3 Vascularització dels nervis perifèrics	39
1.1.4 Mielinització: fibres mielíniques i no mielíniques	41
1.1.5 Fisiologia neuronal	43
1.2 LESIONS DEL NERVI PERIFÈRIC	46
1.2.1 Mecanismes de les lesions nervioses produïdes durant la realització dels bloquejos anestèsics	46
1.2.2 Classificació general de les lesions nervioses	48
1.2.3 Fisiopatologia i mecanismes de recuperació neuronal	52
1.2.4 Clínica de les lesions nervioses	55
1.2.5 Diagnòstic de les lesions nervioses	56
1.2.6 Tractament quirúrgic del nervi perifèric	57
1.3 ECOGRAFIA EN EL NERVI PERIFÈRIC	58
1.3.1 Anestèsia regional ecoguiada (USRA)	60
1.4 TÈCNiques DE MICROSCÒPIA I MOTIUS PER A L'ELECCIÓ DE LA TÈCNICA USADA	64
1.4.1 Microscòpia òptica (MO)	64
1.4.2 Microscòpia electrònica	65
1.4.3 Microscòpia òptica de mostres àmplies	69
1.4.4 Elecció de la tècnica microscòpica	70
1.5 MEDICINA TRANSLACIONAL	71
1.5.1 Experimentació Animal	73
1.5.2 Estudis de lesió nerviosa en experimentació animal	78
2. JUSTIFICACIÓ	87
3. HIPÒTESIS I OBJECTIUS	91
3.1 HIPÒTESIS	91
3.2 OBJECTIUS PRINCIPALS	91
3.3 OBJECTIUS SECUNDARIS	91

4. MATERIAL I MÈTODES.....	95
4.1 ESTUDI 1.	96
4.2 ESTUDI 2.	101
4.3 ESTUDI 3.	104
5. RESULTATS.	109
5.1 ESTUDI 1.	110
5.2 ESTUDI 2.	122
5.3 ESTUDI 3.	124
6. PUBLICACIONS ORIGINALS.	133
6.1 PUBLICACIÓ ORIGINAL 1.....	133
6.2 PUBLICACIÓ ORIGINAL 2.....	151
6.3 ALTRES PUBLICACIONS ORIGINALS.....	161
7. DISCUSSIÓ.....	165
8. NOVES LÍNIES D'INVESTIGACIÓ.....	181
9. CONCLUSIONS.....	187
10. BIBLIOGRAFIA.....	191
11. ANNEXOS.....	207

Agraïments

“La gratitud es dona quan la memòria s’emmagatzema en el cor i no en la ment”
Lionel Hampton.

Aquesta Tesi Doctoral és el resultat d’una bonica aventura que no he recorregut pas sola; és el resultat de tot un seguit de confluències de moments, oportunitats i persones que m’han guiat i que han permès que arribés a bon port. Ha estat una època que ha tingut emocions molt intenses i que han requerit no perdre de vista que és important gaudir del viatge i ser perseverant en tot allò que emprems.

Totes les persones que d’una manera o altra han contribuït a fer-me més feliç durant aquesta època, tenen la meva eterna gratitud. Disculpeu-me si no us nombro a totes però escric aquestes paraules des de l’emoció.

Voldria començar donant les gràcies a les persones que van posar la llavor d’aquesta il·lusió perquè pogués germinar: el Dr. Xavi Sala-Blanch i el Dr. Alberto Prats, els meus mestres ja des de la facultat i en l’actualitat. Gràcies per transmetre’m això tant únic que no totes les persones tenen i que és l’interès per qüestionar una i altra vegada els dogmes existents.

Seguidament, necessito agrair als meus directors de tesi i tutor la seva gran contribució a aquest projecte. Miguel Ángel, gracias por ser una fuente incesante de conocimiento y por ser un ejemplo de mi lema “el movimiento se demuestra andando”; tu capacidad de trabajo es inspiradora. Ángela y Cristina, gracias por ser un apoyo constante, por estar ahí siempre y mantener mi estabilidad emocional en momentos difíciles; con personas como vosotras es fácil mantener la sonrisa y seguir adelante. Dr. Armengol, moltíssimes gràcies per haver mostrat sempre tanta amabilitat, disponibilitat i empatia, ha fet que aquesta Tesi fos més agradable.

Tot l’equip de la Unitat del Dolor mereix també una menció molt especial. Venir a treballar cada dia amb il·lusió és, en gran part, gràcies a vosaltres. Heu viscut tot el procés de forma propera i us agraeixo els ànims constants i la confiança. Sentir-se tant estimat és molt d’agrair. Vicky, moltes gràcies per donar-me en el seu moment l’oportunitat d’entrar en aquest món apassionant i oferir-me una nova realitat. Javi,

gracias por mantener esa confianza y por inspirar y cuidar a esta pequeña gran familia.

A la resta de companys de l'Hospital, que sou molts, moltes gràcies per animar-me en els dies més grisos o inclús quan no us heu adonat que amb un somriure o unes paraules d'ànim m'alegràveu el dia.

I no podria oblidar-me dels grans professionals de la Unitat de Cirurgia Experimental del VHIR i la seva gran dedicació. Marielle, ya hace unos cuantos años que aparecí por vuestra unidad queriendo aprender y colaborar...y de ahí nació una bonita y especial amistad que hace que este viaje siga teniendo mucho recorrido por delante. Sois admirables en vuestro día a día y contagiáis pasión por vuestro trabajo, eso no tiene precio.

I, per últim, a les persones que formen la meua vida, les persones sense les quals no funciono. Als meus amics: Joan, Juli, Jep, Montse, Sonia, Núria, Ivo, Cristina, David, Gerard, Iona, Sara, Marsí, Neus, Gemma i Elena. Gràcies simplement per estar, per saber que en els moments difícils sempre compliu i en els feliços sou els que m'acompanyeu. Gràcies per la paciència i la complicitat.

A la meua família, el meu pilar imprescindible. Els meus pares, Frederic i Anna, que em van inculcar de petita que "tot esforç mereix un bon record", que només posant tota la teua ànima en cada cosa que fas pots aconseguir l'èxit. Malgrat que no ho reconeixeu, gràcies per aquesta "passió de pares" tant poc objectiva i per estar cada cop més units amb el pas dels anys. Kukita, la meua kukita especial, la millor àvia del món i la persona que aconseguix que cada dia m'esforcí més i vulguí ser millor. Els teus records són testimoni d'una vida de perseverància, il·lusió i molt d'amor, com el que em transmetes a diari. Com sempre dius "de cobardes nada se escribe"...espero seguir el teu exemple i que puguis estar sempre orgullosa de mí. Marcos, mi persona especial, gracias por complementarme y por demostrarme lo que es el amor incondicional...tendré que recompensarte tanta paciencia infinita durante esta tesis, pero sabes que sin tí no habría tenido lugar.

I, per últim, a tu Laura...per seguir sent la millor part de mí. T'estimo i et trobo massa a faltar.

Relació de taules, figures i fotografies

Taula 1. Classificació de les fibres nervioses. _____	43
Taula 2. Resum dels estudis experimentals en models animals depenent de la configuració de l'agulla de punció. _____	81
Taula 3. Resum dels estudis d'experimentació en models animals depenent de la localització de l'agulla i lloc d'injecció. _____	83
Taula 4. Mesures de l'estudi ecogràfic dels nervis utilitzats en l'estudi 1. _____	112
Taula 5. Relació d'agulles corresponents a cada espècie depenent de la mida ecogràfica del nervi. _____	207
Figura 1. Estructura anatòmica del nervi perifèric. _____	30
Figura 2. Components de la fibra nerviosa. _____	31
Figura 3. Estructura histològica del nervi perifèric. _____	32
Figura 4. Esquema del plexe intraneural. _____	38
Figura 5. Vascularització del nervi perifèric. _____	40
Figura 6. Senyalització neuronal. _____	44
Figura 7. Propagació del potencial d'acció. _____	45
Figura 8. Classificació de les lesions nervioses segons Seddon. _____	49
Figura 9. Classificació de les lesions nervioses segons Sunderland. _____	51
Figura 10. Rang de mides observables per microscòpia. _____	64
Figura 11. Esquema dels components de la microscòpia òptica. _____	65
Figura 12. Esquema dels components de la microscòpia electrònica de transmissió. _____	66
Figura 13. Esquema dels components de la microscòpia electrònica de rastreig. _____	68
Figura 14. Animals utilitzats en experimentació. _____	74
Figura 15. Estudis de lesió nerviosa en nervi ciàtic de conill. _____	80
Figura 16. Relació dels diàmetres i mides del nervi ciàtic. _____	113
Figura 17. Box plot de l'àrea dels nervis de les diferents espècies. _____	119
Figura 18. Box plot de l'àrea dels fascicles de les diferents espècies. _____	120
Figura 19. Box plot del nombre de fascicles de les diferents espècies. _____	120
Figura 20. Relació entre l'àrea histològica i l'àrea ecogràfica de les diferents espècies. _____	121
Figura 21. Representació de la relació de mides de nervi ciàtic i una agulla de pràctica clínica habitual en humà _____	208
Fotografia 1. Endoneuri envoltant axons mielinitzats. Microscòpia electrònica de rastreig. _____	33
Fotografia 2. Endoneuri envoltant axons mielinitzats. Microscòpia electrònica de transmissió. _____	34
Fotografia 3. Perineuri amb detall de les làmines perineurals. Microscòpia electrònica de rastreig. _____	35
Fotografia 4. Perineuri amb detall de les làmines perineurals. Microscòpia electrònica de transmissió. _____	36
Fotografia 5. Epineuri i paraneuri. Microscòpia electrònica de rastreig. _____	37
Fotografia 6. Axons mielínics i no mielínics dins d'un mateix fascicle. _____	41
Fotografia 7. Axons no mielinitzats. Microscòpia electrònica de transmissió. _____	42
Fotografia 8. Imatges ecogràfiques nervioses. _____	59
Fotografia 9. Possibles localitzacions de l'agulla en el nervi ciàtic porcí. _____	63
Fotografia 10. Microscopi òptic. _____	65
Fotografia 11. Microscopi electrònic de transmissió. _____	67
Fotografia 12. Microscopi electrònic de rastreig. _____	68
Fotografia 13. Microscopi òptic de mostres àmplies. _____	69
Fotografia 14. Preparació i material per a l'estudi ecogràfic: neuroestimulador i ecògraf. _____	97

Fotografia 15. Material quirúrgic utilitzat per a realitzar la dissecció anatòmica.	98
Fotografia 16. Identificació ecogràfica del nervi ciàtic en model oví.	110
Fotografia 17. Identificació i mesura ecogràfica de la mida del nervi (CSA), diàmetre major i menor en el model lagomorf.	111
Fotografia 18. Membre pelvià de l'ovella, vista lateral. Identificació de les referències òssies: tuberositat isquiàtica i trocànter major del fèmur.	113
Fotografia 19. Dissecció membre pelvià de l'ovella, vista lateral.	114
Fotografia 20. Membre pelvià de l'ovella, vista lateral, post desinserció del múscul gluti bíceps.	114
Fotografia 21. Nervi ciàtic de model porcí.	115
Fotografia 22. Detalls anatòmics de la dissecció del nervi ciàtic de les espècies petites.	115
Fotografia 23. Membre pelvià oví, vista medial.	116
Fotografia 24. Imatge histològica de nervi ciàtic de conill i rata amb matriu de mida.	117
Fotografia 25. Comparativa de nervis ciàtics de les 6 espècies animals.	118
Fotografia 26. Experiment d'injecció d'HBS en ciàtic d'ovella.	125
Fotografia 27. Experiment d'injecció de tinta xinesa en ciàtic d'ovella.	126
Fotografia 28. Estudi 2: Nervi ciàtic humà i nervi medià humà. Detalls del comportament del HBS en nervi ciàtic i nervi medià humà a nivell supracondili.	127
Fotografia 29. Estudi 3: Nervi ciàtic de model oví. Detalls del comportament de la tinta xinesa en realitzar les injeccions intraneurals.	128
Fotografia 30. Estudi 3: Nervi ciàtic de model oví. Detalls del comportament del HBS en realitzar les injeccions intraneurals.	129
Fotografia 31. Dissecció de les meninges de conill.	182
Fotografia 32. Dissecció de les meninges de porc.	183
Fotografia 33. Dissecció de les meninges d'ovella.	184
Fotografia 34. Relació de l'agulla i el teixit nerviós.	207

Índex d'abreviatures

µm: micres

AL: anestèsic local

CEEA: comitè ètic d'experimentació animal

CEIC: comitè ètic d'investigació clínica

CSA: àrea de secció transversal

EMG: electromiograma

FA: àrea de la secció transversal del fascicle (per les sigles en anglès)

G: gauge

HBS: solució hemàtica heparinitzada (per les sigles en anglès)

LNP: lesió nervi perifèric

m/s: metres per segon

mA: miliamper

ml: mil·lilitre

mm: mil·límetres

MO: microscòpia òptica

mV: mil·livolt

SEM: microscòpia electrònica de rastreig (per les sigles en anglès)

SNP: sistema nerviós perifèric

SNC: sistema nerviós central

TEM: microscòpia electrònica de transmissió (per les sigles en anglès)

TNA: àrea de la secció transversal del nervi total (per les sigles en anglès)

USRA: anestèsia regional ecoguiada (per les sigles en anglès)

Resum

Les lesions del sistema nerviós perifèric constitueixen un trastorn neurològic freqüent i, en els casos més greus, comporten una inadequada recuperació funcional. L'etiologia és multifactorial però una de les causes que ha generat més interès ha estat el possible dany associat a la realització dels bloquejos nerviosos en anestèsia. L'anestèsia regional pot ocasionar lesió nerviosa mitjançant diversos mecanismes: mecànic per l'efecte traumàtic directe de les agulles, tòxic per l'ús d'altres concentracions i dosis d'anestèsic local, sobretot injectats dins del nervi, i, per últim, per l'efecte isquèmic vascular relacionat amb l'augment de pressió i compressió dels capil·lars. De tots els tipus d'injeccions, la intraneural és la que ha estat associada més àmpliament amb aquests mecanismes lesius i, per tant, a complicacions nervioses més importants. Malgrat l'assoliment d'una major precisió tècnica amb la introducció de l'ecografia, se segueixen produint puncions intraneurals inadvertides i aquest succés ha fet ressorgir antics debats de notable rellevància clínica sobre el seu inherent dany potencial.

La medicina traslacional ha intentat abordar el complex camp de les lesions nervioses, però malgrat haver aprofundit en el coneixement d'aquesta patologia, no hi ha hagut una millora clínica rellevant en aquest tipus de pacients. Al llarg de la història, s'han utilitzat diversos models animals per a l'estudi de les possibles injeccions intraneurals i els resultats s'han extrapolat directament a l'humà i han servit per prendre decisions en la pràctica clínica. No obstant això, aquests estudis són heterogenis envers la metodologia i, sobretot, en quant a l'espècie animal seleccionada i els resultats són freqüentment contradictoris, fet que comporta qüestions sobre la seva validesa en l'humà. És per tant imprescindible el disposar d'una medicina traslacional que reproduïxi de manera fidedigna la fisiopatologia de les lesions nervioses.

La nostra hipòtesi planteja que la variabilitat morfològica del nervi ciàtic entre diferents espècies evidencia l'escàs valor que té l'extrapolació directa d'aquests resultats a l'humà. A més, els diferents marcadors i mètodes de tinció descrits en els estudis d'injeccions intraneurals no han estat sotmesos a una anàlisi crítica i, per tant, poden aportar resultats inconsistents.

L'objectiu fou comparar els nervis ciàtics de diferents espècies de mamífers, inclosa la humana, i validar un nou biomarcador per a l'estudi de les lesions nervioses, com és la sang heparinitzada.

Per donar resposta a aquesta hipòtesi, la Tesi s'ha basat en la realització de tres estudis, tant en model humà com experimental animal.

En el primer estudi es va realitzar una anatomia comparada del nervi ciàtic en sis espècies, incloent la humana, analitzant histològicament la microestructura, i examinant els talls complets del nervi amb alta magnificació mitjançant un microscopi d'alta resolució.

En el segon i tercer estudi es va validar l'ús del nou biomarcador tant en l'humà com en la resta d'espècies animals i es van recollir les dades referents al comportament tissular subsegüent a la injecció intraneural.

Les mostres histològiques dels tres estudis es van processar de la mateixa manera i els talls complets foren escanejats amb imatge d'alta resolució en macro fixers per a la seva anàlisi posterior.

Els resultats obtinguts demostren que l'arquitectura microanatòmica del nervi ciàtic en les espècies seleccionades difereix en les variables estudiades. Les principals diferències es van observar en la relació de la fracció de teixit no neural, a la qual se li atribueix una funció protectora dels fascicles.

Els resultats obtinguts demostren que la solució de sang heparinitzada és una alternativa més fidedigna que la tinta xinesa. És compatible amb la majoria de tincions, les partícules són homogènies i no es produeix el seu desplaçament durant el processament de les mostres histològiques. Els eritròcits mantenen la seva individualitat sense agregar-se en coàguls, són fàcilment identificables i permeten una delimitació exacta de la seva localització i extensió. D'aquesta manera, s'obtenen imatges nítides a augments alts que permeten analitzar amb detall els fenòmens que s'han produït dins d'aquest teixit.

En conclusió, les àmplies diferències microanatòmiques podrien qüestionar els models animals utilitzats en diferents tipus d'estudis sobre lesions nervioses amb la pretensió d'extrapolar aquests resultats a l'humà i a partir d'això generar recomanacions en la pràctica clínica. Considerem que l'elecció correcta del model

animal és crucial depenent de l'objectiu de cada estudi si es pretenen extrapolar els resultats a l'humà. Així mateix, l'ús de la sang diluïda heparinitzada com nou marcador aporta una major precisió en l'estudi de les injeccions intraneural respecte a la tradicional tinta xinesa. Després d'una injecció intraneural deliberada, els eritròcits es localitzen principalment fora dels fascicles i no entren en contacte directe amb els axons, qüestionant el fet que la injecció intrafascicular estigui sempre associada de manera indiscutible a la injecció intraneural. Per aquest motiu, considerem que es requereix reavaluar les teories que justifiquen l'efecte lesiu de les injeccions intraneurals.

INTRODUCCIÓN

*“No puedo cambiar la dirección del viento,
pero sí ajustar mis velas para llegar a mi destino”*

James Dean.

1. INTRODUCCIÓ.

Les lesions del nervi perifèric (LNP) representen un trastorn neurològic comú, que afecta aproximadament a uns 20 milions de persones i comporta un cost estimat de 150.000 milions de dòlars anuals als Estats Units¹. Té una especial rellevància atès que són més freqüents i infravalorades que les lesions medul·lars².

Les lesions inicials més greus, malgrat el tractament quirúrgic precoç, acostumen a comportar una pobra regeneració nerviosa i una inadequada recuperació funcional, per la qual cosa provoquen importants repercussions tant personals com laborals³.

La investigació experimental en el camp de la regeneració nerviosa es va iniciar fa més d'un segle, amb la preocupació dels neurocientífics per entendre el principi organitzatiu, funcional i regeneratiu del sistema nerviós. Malgrat que en les últimes dècades hi ha hagut un important avenç en el camp del coneixement de les LNP, no s'ha vist reflectit en una millora clínica de les lesions⁴⁻⁷. Probablement les causes són multifactorials, però cal mencionar el paper determinant de la medicina translacional. La realització d'investigacions en nervi perifèric humà no sempre s'ha pogut dur a terme i, per aquest motiu, tradicionalment s'ha recorregut al model animal. És important destacar, com s'ha demostrat, que proteïnes implicades en el manteniment de la barrera hematoneural es comporten de diferent manera segons l'espècie animal⁸. Per aquest motiu, és important tenir en compte que les conclusions extrapolades de models experimentals animals a humans poden ser una font de confusió i error i s'han d'extraure cautelosament.

Malgrat això, els inicis de l'experimentació animal en el camp de l'anestèsia regional van obrir un ampli ventall d'oportunitats per a aprofundir en el complex tema de les lesions nervioses. Paradoxalment, en ocasions aquests estudis pioners van aconseguir resultats totalment contradictoris que també van fer trontollar les bases del coneixement^{9,10}.

L'etiologia de la LNP és molt diversa, identificant-se factors predisposants com la hipertensió, l'hàbit tabàquic i la diabetis^{11,12}. El mecanisme d'origen també està

Introducció

relacionat amb el grau de lesió, que determinarà el tractament apropiat i, consegüentment, el temps de recuperació i el cost econòmic associat¹³.

Totes aquestes consideracions ens porten a plantejar la realització d'aquesta Tesi per tal d'aprofundir en les bases preclíniques i, a partir d'aquí, intentar aportar coneixement i noves línies d'investigació a aquesta patologia.

1.1 Sistema nerviós perifèric.

1.1.1 Estructura dels nervis perifèrics.

El sistema nerviós perifèric (SNP) està format pel conjunt dels nervis que s'estenen més enllà dels foràmens intervertebrals de la columna i dels forats de la base del crani. Aquesta és una classificació morfològica i arbitrària de tipus macroscòpic, atès que des d'un punt de vista microanatòmic, aquesta divisió entre el sistema nerviós central (SNC) i el SNP no presenta un límit tan clar en aquest mateix nivell.

El SNP, a diferència del SNC, no disposa d'una cobertura òssia i, per tant, és més vulnerable a les lesions traumàtiques. El SNP s'origina en els 12 parells de nervis cranials i en els 31 parells de nervis espinals.

El SNP és l'encarregat d'arribar a totes les àrees corporals per proporcionar tant innervació motora, com sensitiva i neurovegetativa a través de projeccions cel·lulars de gran longitud, els axons, recoberts per cèl·lules de Schwann¹⁴. Per poder desenvolupar de manera òptima les seves funcions, requereix que hi hagi una integritat histològica i una correcta interacció entre les projeccions, les cèl·lules de Schwann i el teixit connectiu¹⁵.

Des del punt de vista embriològic segueix existint controvèrsia respecte a l'origen dels components no neurals del nervi com les cèl·lules perineurals, els fibroblasts endoneurals o els pericits¹⁶. Així mateix, també es suggereix que cèl·lules mare pluripotents de la cresta neural podrien generar diferents tipus cel·lulars com les neurones o les cèl·lules de Schwann¹⁷.

Amb respecte al tipus de neurones, el SNP conté neurones motores (o eferents), sensibles (o aferents), i neurones de naturalesa simpàtica i parasimpàtica, que conformen el sistema nerviós autònom. Els nervis estan formats per la suma d'axons, també anomenats fibres nervioses, que s'estenen distalment des de l'orifici extern del canal foraminal fins l'efector, o proximalment fins el mateix orifici foraminal.

Les fibres motores s'originen en les neurones de les banyes anteriors medul·lars, mentre que les sensibles estan formades per les dendrites i els axons de les neurones sensibles bipolars localitzades en els ganglis de les arrels posteriors (Figura 1).

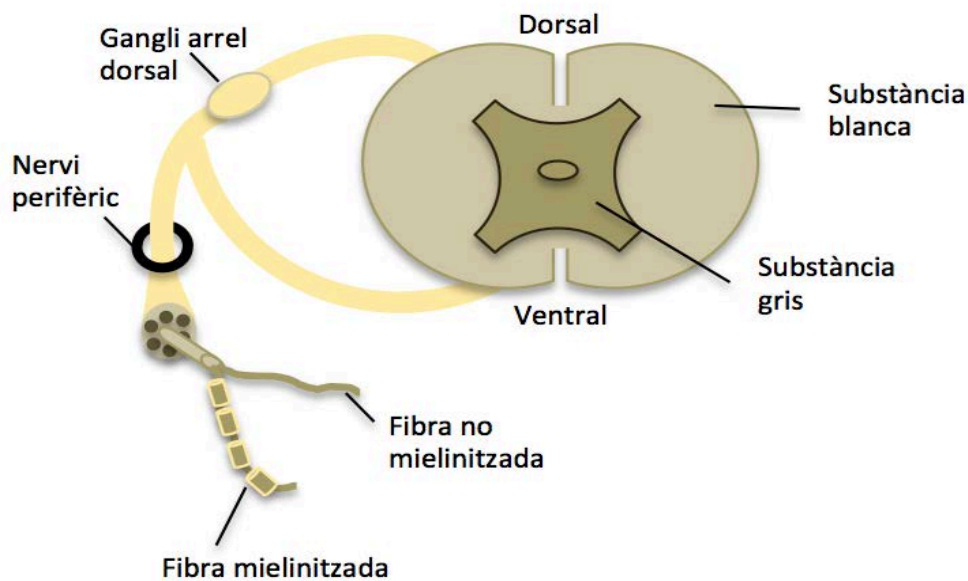


Figura 1. Estructura anatòmica del nervi perifèric.

Les fibres motores són mielíniques del tipus $A\alpha$, i les sensibles estan constituïdes per fibres tipus A, fibres $A\delta$ mielíniques i tipus C no mielíniques. Les fibres sensibles es poden localitzar tant en els sistemes cutanis (nociceptors, termoreceptors, i mecanoreceptors), com en els profunds (propioreceptors). Per últim, les fibres simpàtiques són prolongacions postganglionars de les cadenes ganglionars simpàtiques que ocupen la regió toracolumbar de la columna.

La major part del nervis perifèrics són del tipus mixt, és a dir, contenen neurones motores i sensibles. Així mateix, dins d'un mateix fascicle poden trobar-se neurones de diferents tipus¹⁸⁻²⁰.

1.1.2 Histologia del nervi perifèric.

La neurona està formada pel cos cel·lular i els processos citoplasmàtics que es divideixen en axó i dendrites²¹ (Figura 2). Una fibra nerviosa és l'extensió de la neurona i està formada per un axó i una beina de mielina (en cas que sigui mielínica).

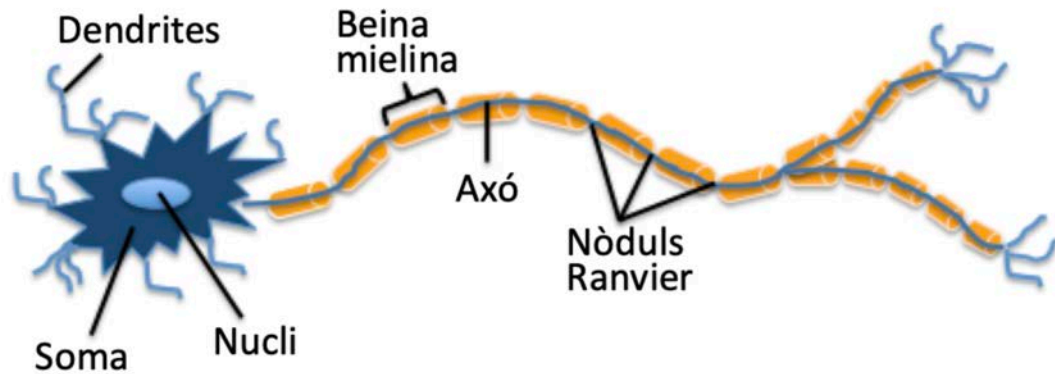


Figura 2. Components de la fibra nerviosa.

L'axó té una funció única, pròpia de la neurona, especialitzada en conduir els impulsos elèctrics des del cos de la neurona. La membrana plasmàtica de l'axó es denomina axolema i el citoplasma es denomina axoplasma²². Des del punt de vista histològic, la suma d'axons, cèl·lules de Schwann, teixit connectiu i vasos formen un nervi perifèric.

El nervi està format per diverses capes de teixit connectiu: endoneuri, perineuri i epineuri (Figura 3), que en conjunt li confereixen resistència i flexibilitat, protegint-lo de les forces mecàniques durant els moviments corporals¹⁶. El perineuri agrega a més a més la funció de barrera farmacològica davant l'arribada d'eventuals tòxics. Aquestes tres capes es presenten al llarg de tot el recorregut del nervi i s'observen variacions en el seu gruix conforme el nervi va dividint-se. Així mateix, per fora, cada nervi està embolcallat en compartiments grassos, generalment concèntrics, limitats per membranes de fibres de col·lagen similars a l'epineuri denominades circumneuri (paraneuri).

A part d'aquestes capes de teixit connectiu, també hi ha cèl·lules lliures com mastòcits, fibroblasts, macròfags, fibres lliures de col·lagen, fibres elàstiques i fibres de reticulina²³⁻²⁵. La capacitat d'elongació i adaptació del nervi al moviment ve donada per l'elasticitat de les fibres elàstiques i pel patró de distribució de les fibres de col·lagen entrelaçades.

Mitjançant els estudis de microscòpia s'ha pogut demostrar en totes les capes, les seves característiques morfològiques i funcionals.

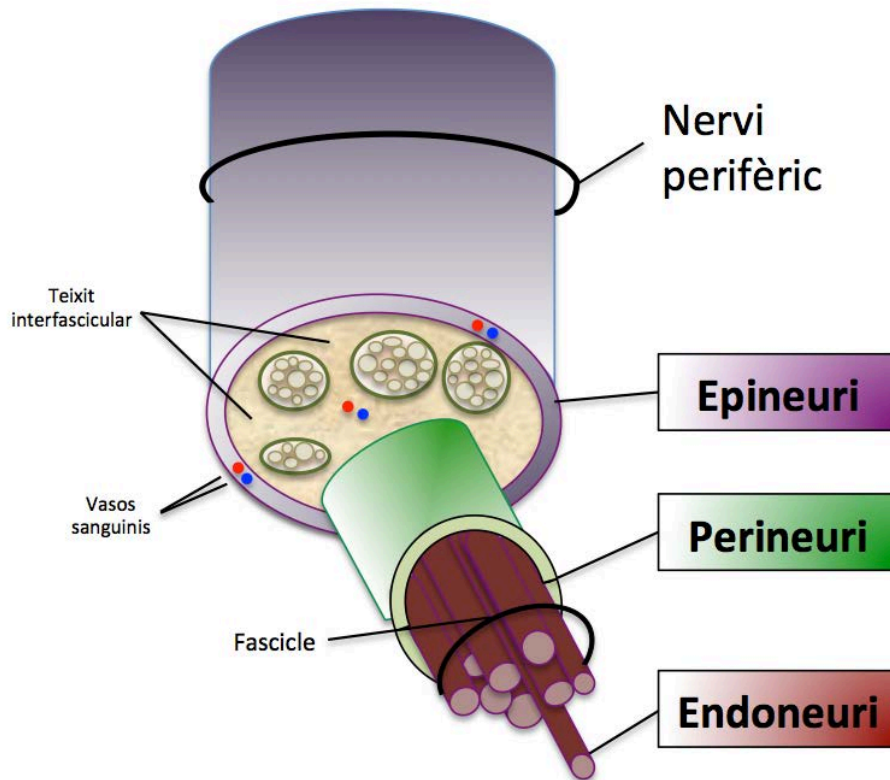
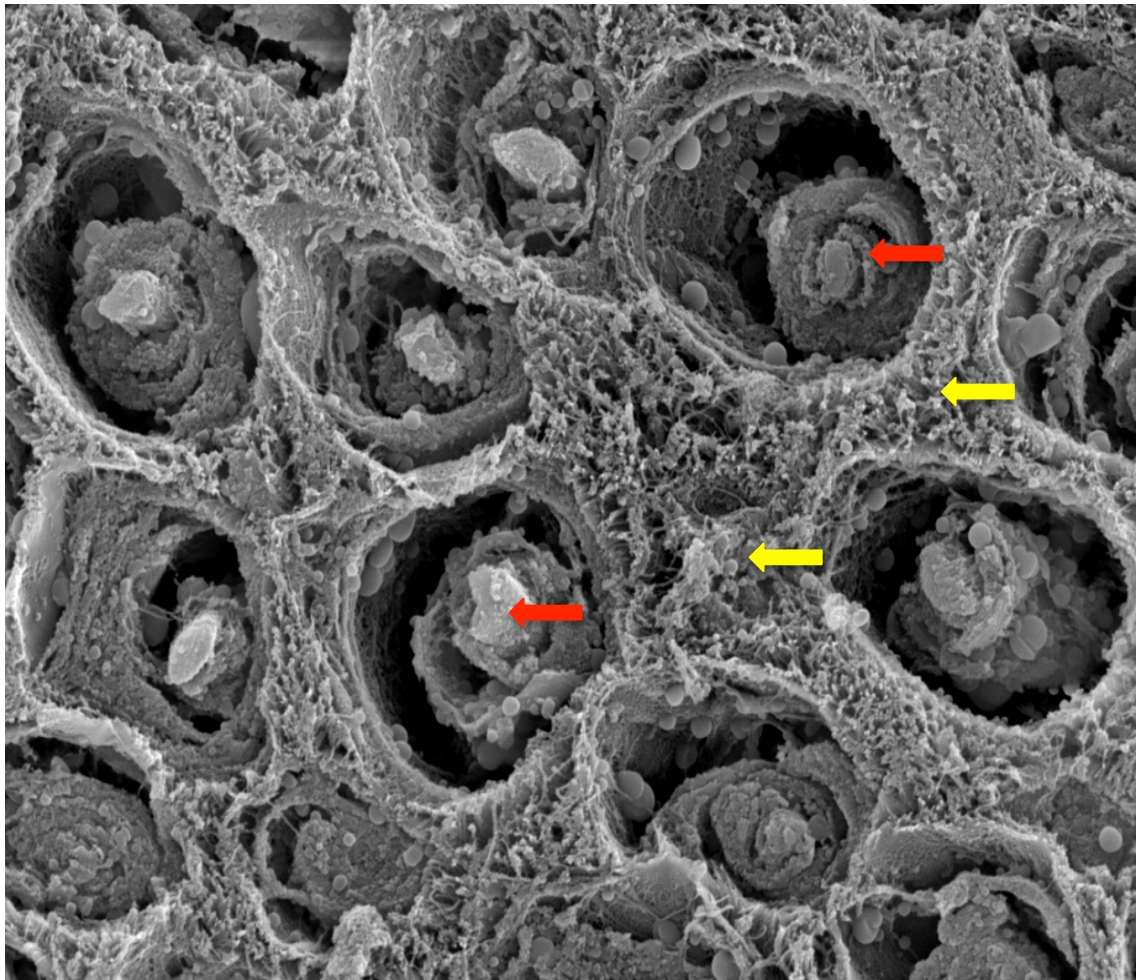


Figura 3. Estructura histològica del nervi perifèric.

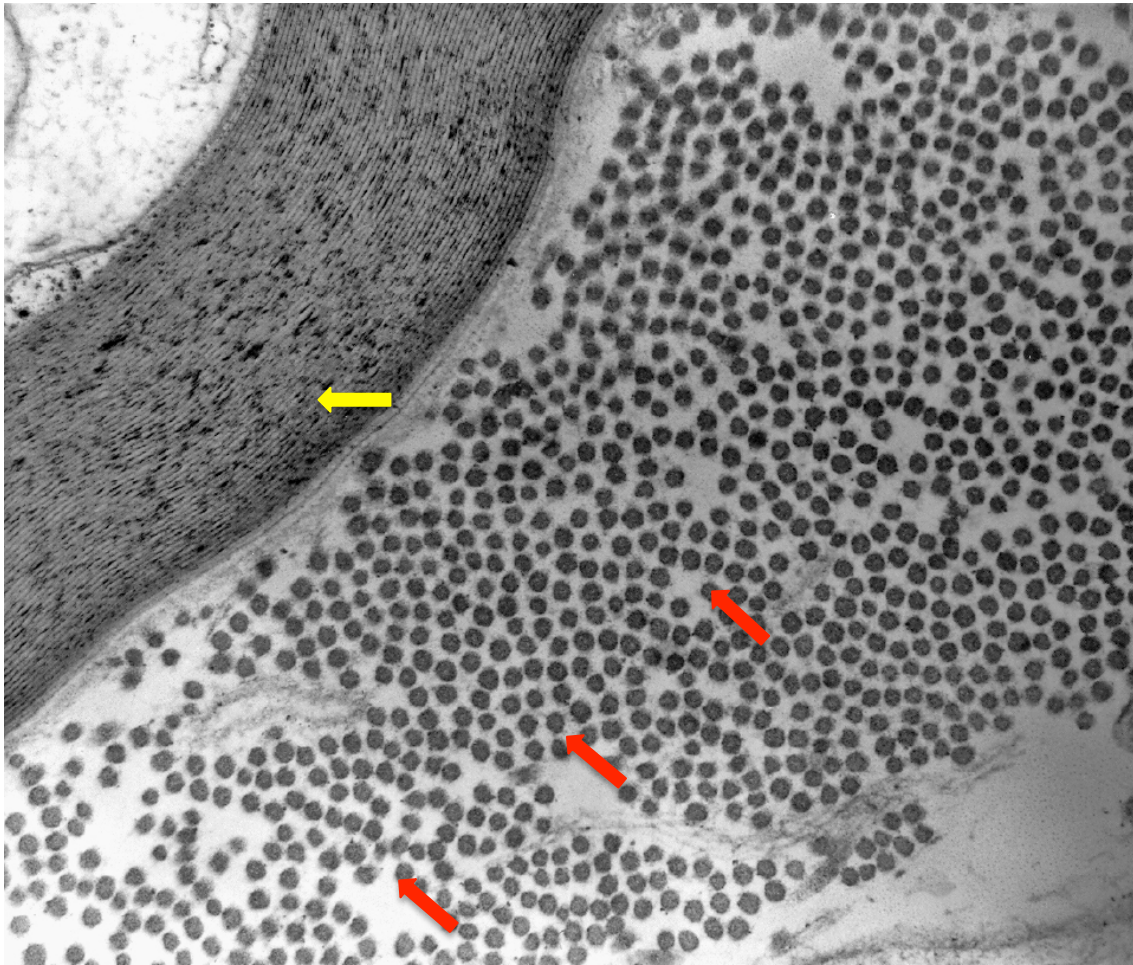
1.1.2.1 Endoneuri.

És una fina làmina cilíndrica que envolta els axons juntament amb les cèl·lules de Schwann, i que omple tot l'espai existent entre els axons dins del fascicle i per dins del perineuri. Està formada per dues làmines: una externa amb una agrupació de fibres longitudinals, i una altra interna amb una disposició de fibres més erràtica²⁶. El principal productor de col·lagen són les pròpies cèl·lules de Schwann i en menor mesura els fibroblasts. L'endoneuri, gràcies a la seva permeabilitat, permet el pas de molècules, és a dir, no té efecte barrera farmacològica.

L'endoneuri constitueix un entorn protector per als axons i les cèl·lules de Schwann i exerceix un paper important en la funció de regeneració dels axons lesionats després de patir lesions parcials o no completes del nervi, actuant com una matriu de suport i guia pels extrems seccionats dels axons¹⁹.



Fotografia 1. Endoneuri envoltant axons mielinitzats. Microscòpia electrònica de rastreig. Fletxa groga: endoneuri, fletxa vermella: axons mielinitzats. Amb permís de l'autor²⁷.



Fotografia 2. Endoneuri envoltant axons mielinitzats. Microscòpia electrònica de transmissió. Fletxa groga: axó mielinitzat, fletxa vermella: endoneuri. Amb permís de l'autor²⁷.

1.1.2.2 *Perineuri.*

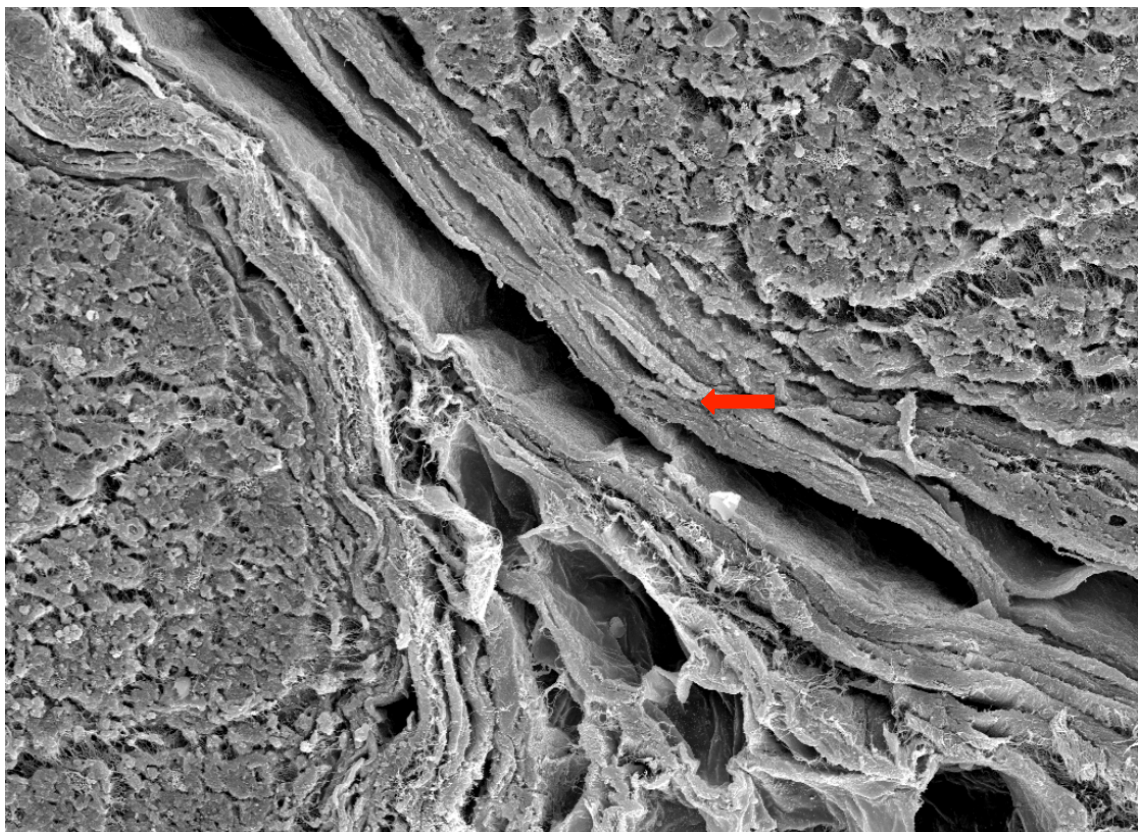
Està compost per múltiples capes cel·lulars concèntriques, cada una d'elles d'una cèl·lula de gruix, que envolten a cadascun dels fascicles nerviosos. El perineuri ajuda a mantenir la pressió intrafascicular. En cadascuna de les làmines perineurals es troben cèl·lules unides unes amb altres mitjançant unions estretes (*tight junctions*), i desmosomes que contribueixen a formar una barrera semipermeable per a la difusió de partícules. Aquestes unions estretes s'estenen al llarg de tota la membrana de les cèl·lules perineurals reduint al mínim l'espai entre aquestes cèl·lules, formant una paret cel·lular que obliga a totes les molècules que necessiten travessar aquesta làmina perineural a fer una transició transcel·lular, atès que no existeix espai intercel·lular. Els desmosomes són unions que no

segellen l'espai intercel·lular sinó que aporten una unió reforçada a zones puntuals i que augmenten la resistència mecànica del conjunt.

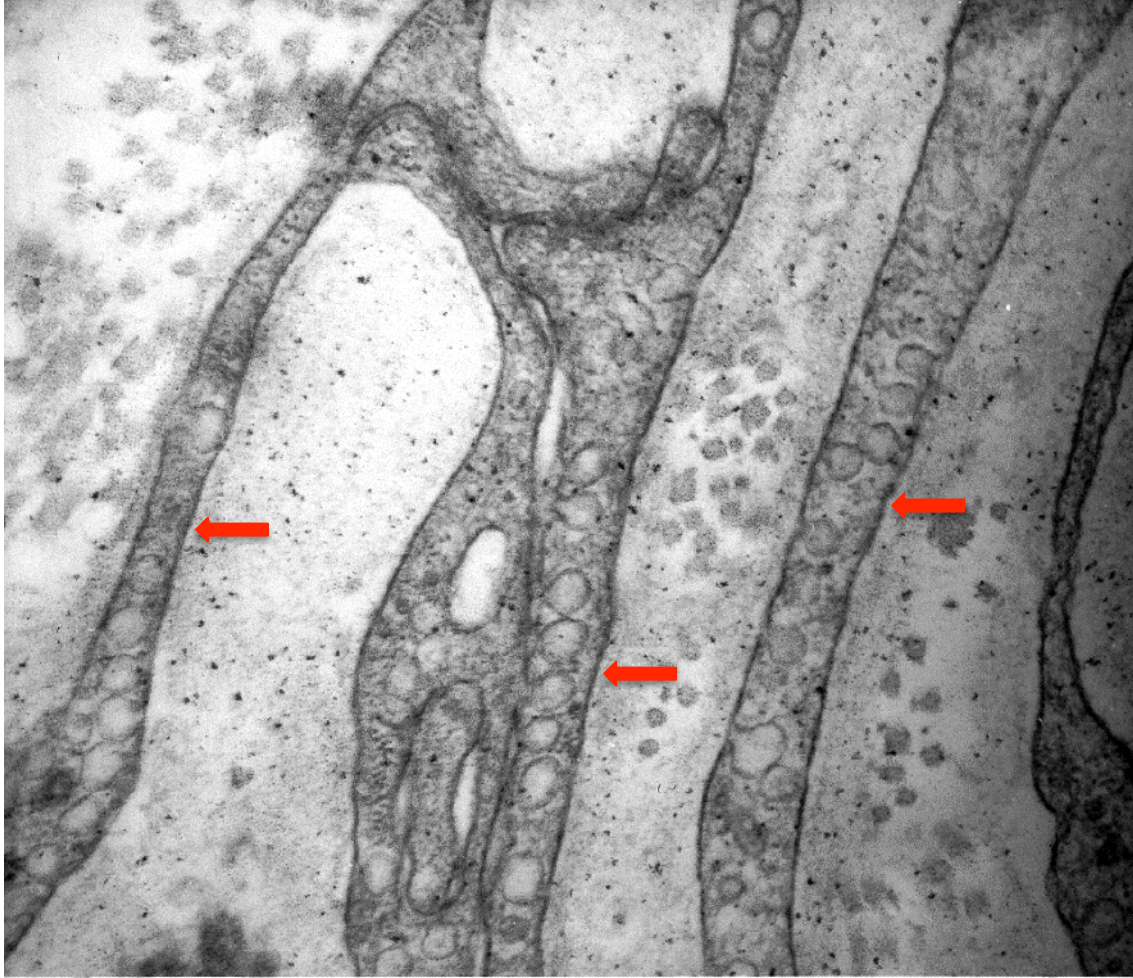
Les capes internes del perineuri més proximals als fascicles nerviosos contenen un major nombre d'aquestes unions especialitzades.

Habitualment es troben de 8-16 capes perineurals concèntriques²⁸. El número de capes està en relació amb el diàmetre del fascicle, sent el número major en fascicles més grans.

El perineuri permet un cert grau de moviment als axons, i forma part del sistema de la barrera hematoneural. Aquesta barrera, similar a la coneguda barrera hematoencefàlica, manté un efecte barrera (encara que menys efectiva) i es completa amb l'efecte barrera que aporten les cèl·lules endotelials dels capil·lars intrafasciculars oferint una defensa efectiva enfront agents tòxics.



Fotografia 3. Perineuri amb detall de les làmines perineurals. Microscòpia electrònica de rastreig. Amb permís de l'autor²⁷.



Fotografia 4. Perineuri amb detall de les làmines perineurals. Microscòpia electrònica de transmissió. Amb permís de l'autor²⁷.

1.1.2.3 *Epineuri.*

És la capa més externa i està composta majoritàriament per fibres de col·lagen envoltant el nervi. La nomenclatura és confosa i alguns autors han denominat epineuri a la cobertura externa del nervi juntament amb tot el teixit interfascicular. Per aquesta raó s'esmenta que està format principalment per greix i vasos, quan realment la cobertura externa està fonamentalment formada per fibres de col·lagen.

Aquesta nomenclatura confosa al·ludeix que l'epineuri varia al llarg del nervi adquirint més importància al voltant de les zones articulars, i que l'epineuri representa entre el 30-75% de l'àrea de secció del nervi²⁹, quan en realitat aquest

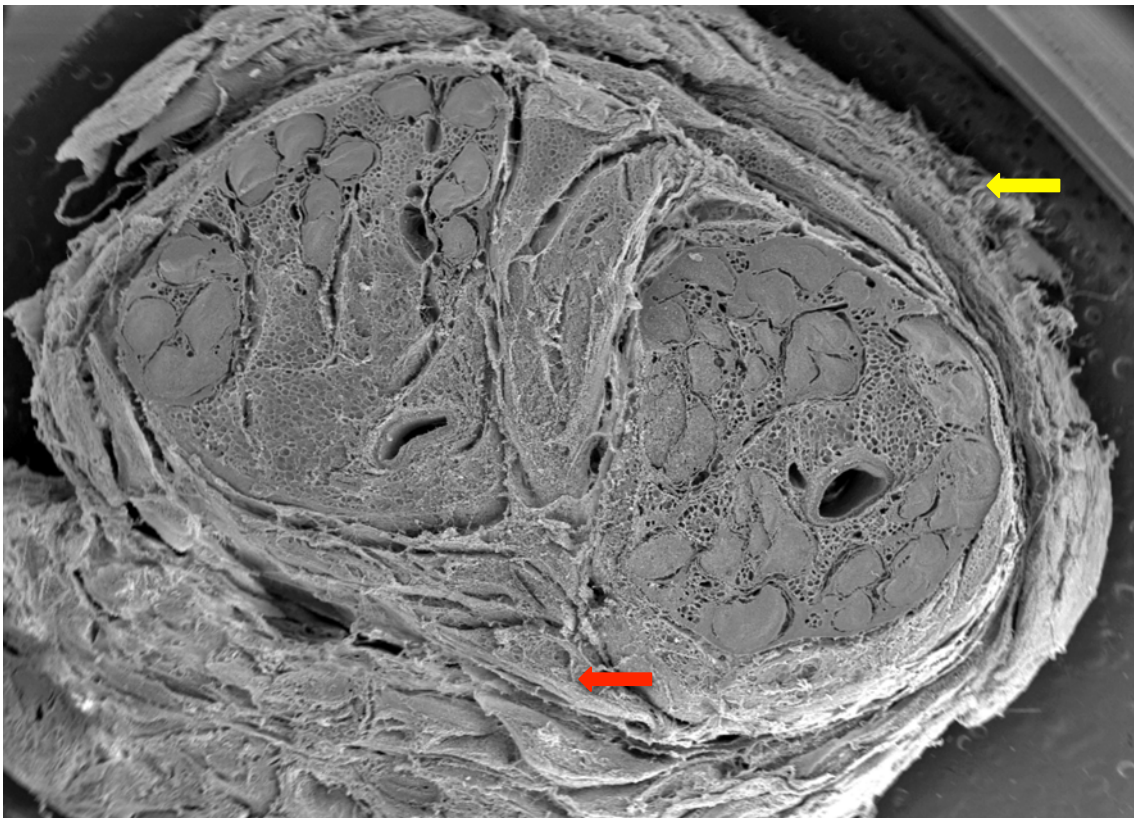
concepte es refereix a la quantitat de teixit adipós que hi ha per fora dels fascicles (teixit interfascicular).

És per aquesta raó que altres autors fan la distinció entre epineuri interfascicular (teixit interfascicular) i epi-epineuri (l'epineuri pròpiament dit)¹⁹.

A diferència del perineuri, l'epineuri és una capa permeable, atès que no hi ha unions estretes entre les cèl·lules sinó fibres de col·lagen entrelaçades.

1.1.2.4 *Circumneuri (Paraneuri).*

Els nervis estan delimitats externament per compartiments grassos limitats per membranes similars a l'epineuri. Les fibres de col·lagen són una extensió de l'adventícia dels grans vasos i l'epimisi dels músculs veïns. En el gruix d'aquestes membranes és freqüent trobar capil·lars.



Fotografia 5. Epineuri i paraneuri. Microscòpia electrònica de rastreig. Fletxa vermella: epineuri, fletxa groga: paraneuri. Amb permís de l'autor²⁷.

1.1.2.5 *Plexe intraneural.*

En fer talls histològics successius al llarg d'un nervi es visualitzen mapes de l'interior del nervi amb fascicles que canvien la seva ubicació, mida i nombre. Aquests mapes o topogrames ens permeten comprovar que els axons no mantenen sempre la mateixa localització al llarg del seu recorregut. Per contra, la seva posició dintre dels fascicles es modifica; pot passar d'un fascicle a un altre ocupant una posició més perifèrica o més central dins del nervi (Figura 4).



Figura 4. Esquema del plexe intraneural.

En els seus primers estudis Sunderland ja va demostrar que en un trajecte de 46 mm de llargada podia haver fins a 23 canvis de topografia dels fascicles, i probablement la causa està relacionada amb el desenvolupament embriogènic. Les variacions topogràfiques venen determinades per intercanvis dels axons entre diferents fascicles. Aquesta transferència té lloc des de zones molt pròximes a l'espai epidural mantenint-se fins les zones més distals.

També el nombre de fascicles i àrea fascicular van modificant-se al llarg del nervi. En zones pròximes a emergències de branques nervioses o articulacions augmenta el nombre de fascicles i disminueix la seva àrea³⁰⁻³². A aquesta observació se li atribueix un efecte autoprotector dels nervis a prop d'estructures articulars on la pressió o l'estirament podrien danyar els fascicles nerviosos, i és per aquest motiu que augmenta el teixit connectiu o no fascicular. D'aquesta manera, s'ha demostrat

que la ràtio de teixit fascicular i de teixit connectiu varia depenent de la porció de nervi estudiada i, en general, podem parlar d'una variació molt àmplia, entre el 25-75% de l'àrea total del nervi³³.

Darrerament els esquemes presentats per Sunderland han estat revisats i reemplaçats per imatges reals del plexe intraneural gràcies a l'estudi amb tècniques no invasives com la tomografia de projecció òptica (OPT, per les seves sigles en anglès)³⁴.

1.1.2.6 *Sinònims de terminologia.*

Alguns dels termes utilitzats es presenten o han estat descrits de diferents maneres. A continuació es mostren les correspondències dels mateixos:

Endoneuri: compartiment endoneural, endoneurum, beina de Henle.

Perineuri: perineurium, capes perineurals.

Epineuri: epineurium, epi-epineuro, epineuri epifascicular, beina epineural comuna.

Paraneuri: beines paraneurals, conjunctiva nervorum, adventitia, mesoneuri, beina circumneural, circumneurium.

1.1.3 *Vascularització dels nervis perifèrics.*

Els nervis perifèrics estan molt vascularitzats en tota la seva longitud, i disposen de dos sistemes de subministrament vascular: l'extrínsec que consta d'artèries, arterioles i venes en l'epineuri, i l'intrínsec format per capil·lars localitzats entre els fascicles i l'endoneuri³⁵. Aquests sistemes estan interconnectats mitjançant vasos originats a l'epineuri i que creuen el perineuri.

Existeixen dos tipus de capil·lars: fenestrats o discontinus, localitzats en la part externa dels fascicles nerviosos, i els capil·lars no fenestrats o continus al seu interior.

La major part dels capil·lars dels diferents teixits del cos són del tipus fenestrat, i els del SNC són del tipus continu (Figura 5). Els capil·lars continus ocupen tots els fascicles arribant fins les capes més externes del perineuri.

Introducció

Els capil·lars estan formats per conjunts de cèl·lules endotelials envoltades de membrana basal. Al seu torn, els capil·lars estan envoltats per 3-6 perícits, que serien l'equivalent de la micròglia del SNC, sent els responsables de la regeneració de la membrana basal i de l'activitat fagocítica¹⁹.

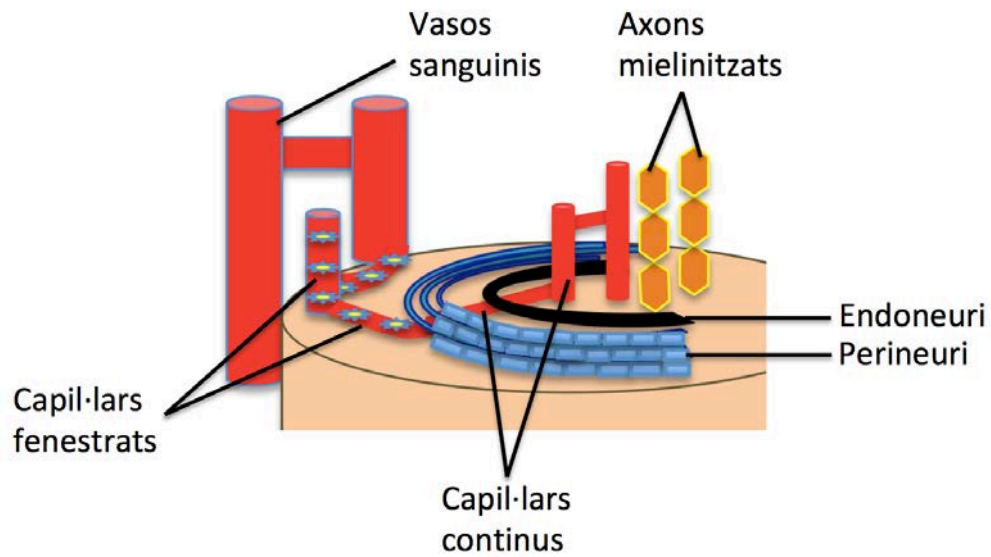
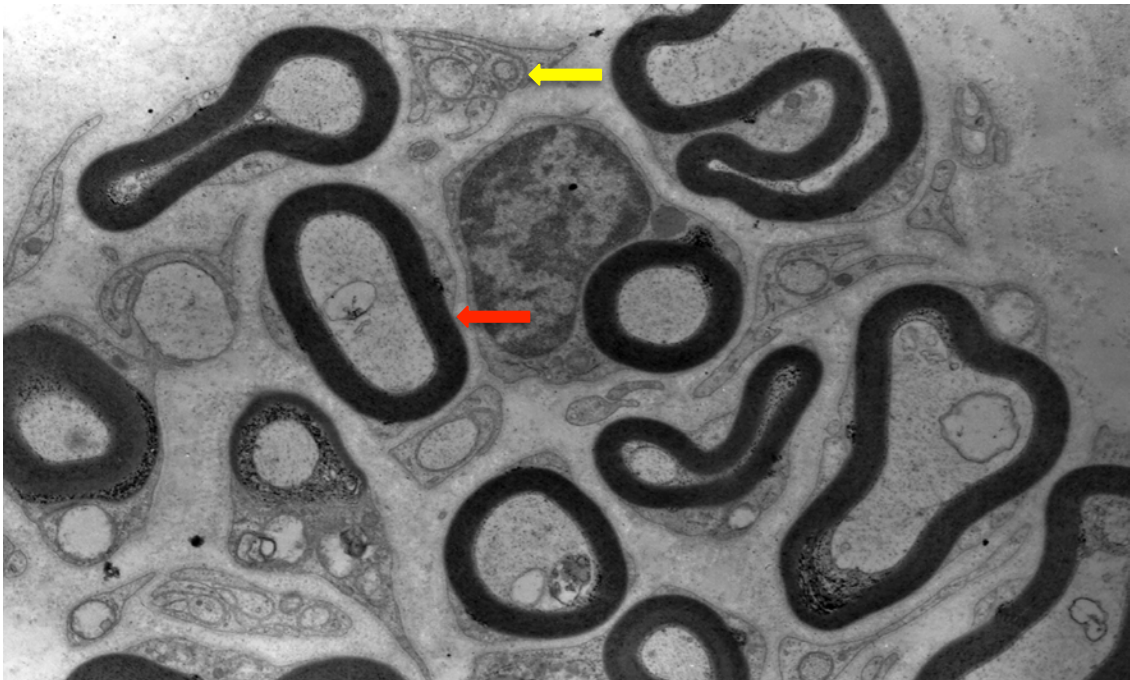


Figura 5. Vascularització del nervi perifèric.

1.1.4 Mielinització: fibres mielíniques i no mielíniques.

Segons la histologia, les fibres nervioses es poden dividir en dos tipus d'axons: axons mielínics si estan enfundats de manera individual per les cèl·lules de Schwann i axons no mielínics si no estan recoberts per múltiples làmines de mielina³⁶. Es podria dir que els axons dins del nervi perifèric mai estan “despullats” ja que d’una manera o una altra estan recoberts pel producte de les cèl·lules de Schwann^{22,37}.



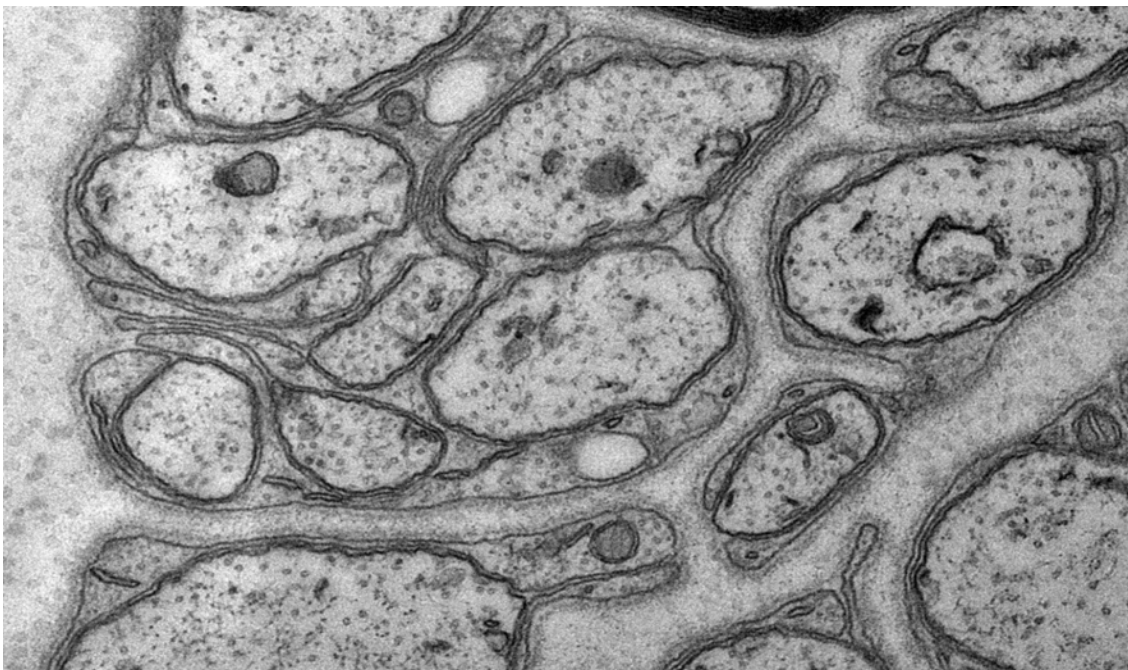
Fotografia 6. Axons mielínics i no mielínics dins d'un mateix fascicle. Microscòpia electrònica de transmissió. Amb permís de l'autor²⁷.

En els axons mielínics, les beines de mielina constitueixen les membranes plasmàtiques que es pleguen i envolten l'axó. En aquest tipus d'axons, les cèl·lules de Schwann es cargolen successivament, de forma que entre dues cèl·lules de Schwann s'alternen zones de discontinuïtat denominades nòduls de Ranvier. La despolarització i repolarització dels axons mielínics, s'origina en aquests nòduls atès que són rics en canals dependents de voltatge, produint-se una transmissió “a salts” de nòdul a nòdul. La distància existent entre dos nòduls de Ranvier es denomina espai internodal i correspon a l'amplada d'una cèl·lula de Schwann;

Introducció

aquesta distància pot ocupar 1-1,2 mm. Des d'un punt de vista pràctic, s'han de bloquejar amb anestèsic local almenys 3 nòduls de Ranvier consecutius, per tal d'aconseguir de forma efectiva un bloqueig anestèsic. Existeix una relació directa entre el diàmetre i la longitud de l'axó i el nombre de les espines de la membrana plasmàtica que es cargolen al seu voltant, i del qual depèn el gruix de la mielina³⁸. La beina de mielina es compon de lípids mixtes bimoleculars^{19,39,40} alternant amb fines capes úniques de proteïna. El diàmetre extern mesura 2-18 μm .

D'altra banda, els axons no mielínics no disposen de beina de mielina ja que les cèl·lules de Schwann no es cargolen al voltant dels axons per produir espines, encara que sí que existeix una relació amb aquestes cèl·lules. De forma successiva, les cèl·lules de Schwann adopten una posició central envoltada de 6-14 axons de petit diàmetre, i les extensions de la membrana plasmàtica d'aquestes cèl·lules es cargolen de forma incompleta en aquests axons. Cadallengüeta de membrana plasmàtica produeix una sola espira de manera incompleta, que és l'extensió mínima i indispensable per a sostenir cada axó. Aquestes llengüetes també envolten paquets de fibres de col·lagen que aporten una major resistència mecànica al conjunt. D'aquesta manera es formen paquets d'axons paral·lels subjectats per successives cèl·lules de Schwann⁴¹. El diàmetre extern és menor que en les fibres mielíniques, arribant a mesurar 0,1-3 μm .



Fotografia 7. Axons no mielinitzats. Microscòpia electrònica de transmissió. Amb permís de l'autor²⁷.

La despolarització i repolarització en aquests axons es produeix de manera contínua al llarg de tota la membrana de l'axó i no "a salts", per la qual cosa la velocitat de conducció és menor. Els axons no mielínics representen el 75% dels nervis cutanis i de les arrels dorsals espinals, el 50% de les fibres que innerven els músculs i el 30% de les arrels ventrals espinals^{42,43}.

Així mateix, les fibres nervioses també poden classificar-se en funció del seu grau de mielinització i velocitat de conducció^{44,45} (Taula 1):

Fibra	Mielina	Diàmetre (µm)	Velocitat conducció (m/s)	Funció
A α	+++	12-20	70-120	Motor
A β	+++	5-12	30-70	Tacte, propiocepció
A γ	+++	3-6	15-30	To muscular
A δ	+++	2-5	12-30	Dolor, tacte, temperatura freda
B	+	<3	3-15	Autonòmica
C	-	0,5-2,3	0,5-2,3	Autonòmica, dolor, tacte, temperatura calenta

Taula 1. Classificació de les fibres nervioses.

1.1.5 Fisiologia neuronal.

La senyalització neuronal està regulada per gradients elèctrics a través de les membranes dels axons i mitjançant impulsos elèctrics.

El potencial de membrana o gradient elèctric basal es manté mitjançant bombes d'ions i en un axó en repòs és de l'ordre de -70 mV. El gradient electroquímico pot modificar-se depenent de la permeabilitat de les proteïnes dels canals iònics, per determinades substàncies transmissores i pel voltatge existent al llarg de l'axó.

Per aconseguir una despolarització, el corrent ha d'assolir un llindar per tal d'obrir els canals, els quals s'activen pel voltatge i provoquen un canvi en el potencial de membrana. A continuació esdevé el procés de repolarització, conegut com

Introducció

potencial d'acció, en el que les àrees properes s'aniran despolaritzant al seu torn, generant una ona de propagació del potencial d'acció (Figura 6). Aquesta velocitat de conducció depèn de diverses variables, entre elles la capacitat i la resistència de l'axó i el tipus de conducció.

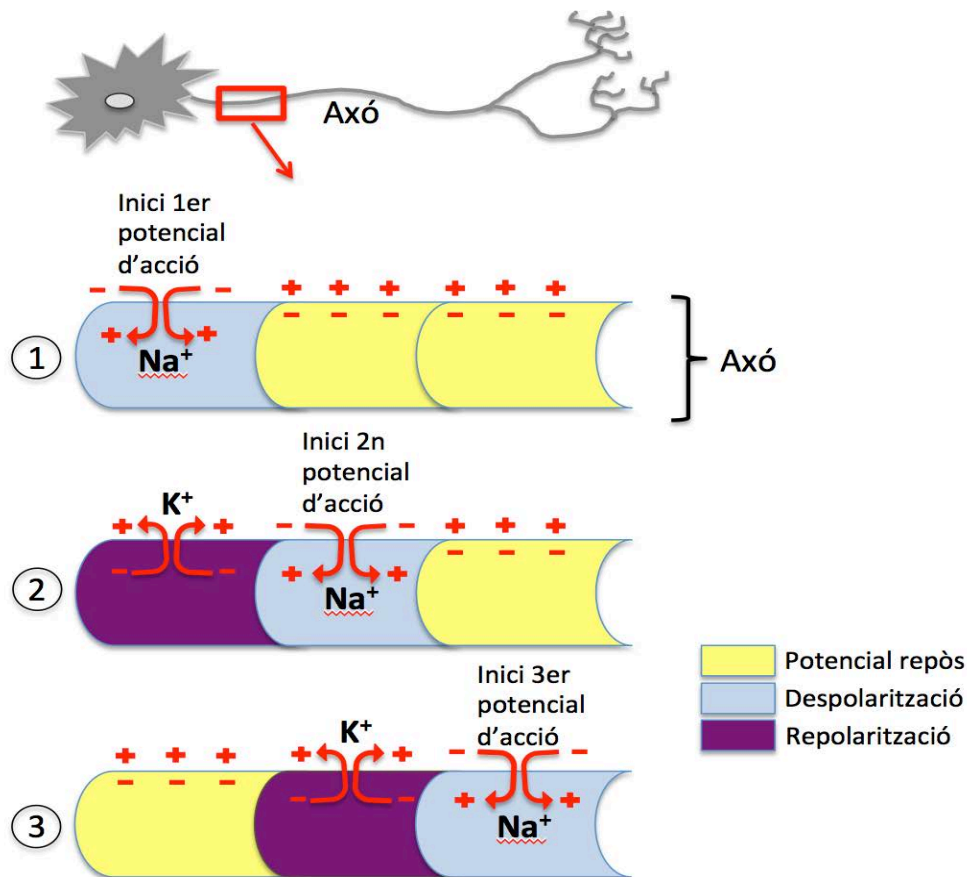


Figura 6. Senyalització neuronal.

La mielina augmenta la velocitat a la que es propaguen els impulsos elèctrics i produeix una conducció "a salts". La mielina optimitza el corrent elèctric augmentant la resistència elèctrica al llarg de l'axó i a costa de mantenir una distribució heterogènia dels canals de sodi al llarg de la fibra. Això s'aconsegueix per l'alta densitat de canals de sodi fàcilment excitables als nòduls de Ranvier, i a la baixa densitat de les regions paranodals. Degut a que es redueixen les pèrdues de sodi cap a les regions extracel·lulars es pot mantenir una correcta separació de les càrregues elèctriques i, d'aquesta manera, permetre que el sodi es mogui més

eficientment al llarg de l'axó⁴⁶. Gràcies al nòdul de Ranvier, existeix una restauració constant de nivells similars als produïts al començament de l'axó, mantenint la ràpida propagació de la conducció. S'ha demostrat que aquesta velocitat pot arribar als 10-500 m/s⁴⁷.

En els axons no mielínics, la propagació de l'impuls elèctric és de menor magnitud atès que es propaga de forma contínua com un moviment d'ona (Figura 7).

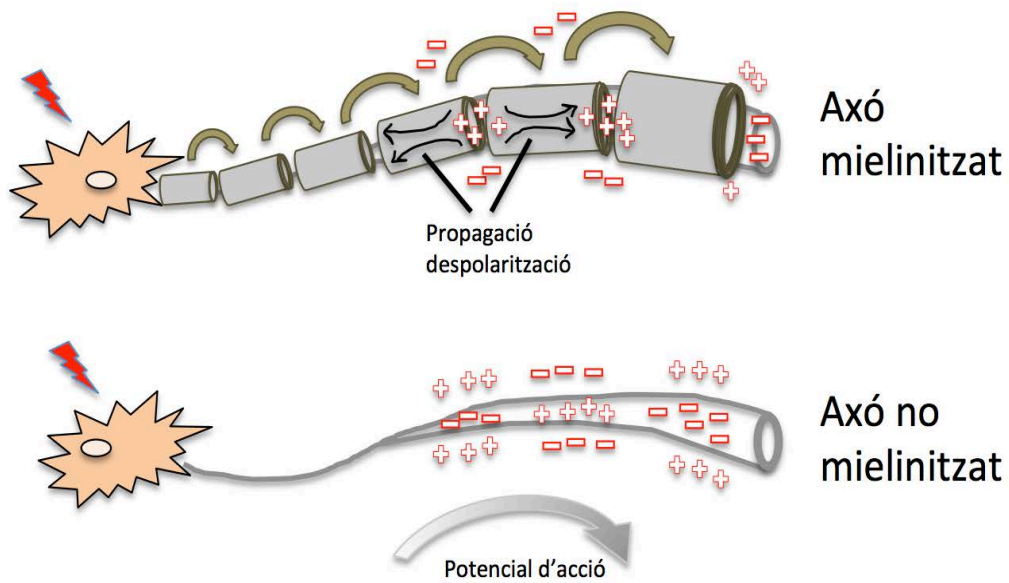


Figura 7. Propagació del potencial d'acció.

1.2 Lesions del nervi perifèric.

1.2.1 Mecanismes de les lesions nervioses produïdes durant la realització dels bloquejos anestèsics.

Els nervis perifèrics poden ser lesionats per diferents mecanismes i poden classificar-se en 3 categories: mecànics o traumàtics, vasculars o isquèmics i neurotòxics; no obstant això, en moltes ocasions en la pràctica clínica s'observen associacions de diversos mecanismes i és poc freqüent trobar formes pures^{48,49}.

Les causes mecàniques/traumàtiques estan relacionades amb les possibles lesions ocasionades amb els bisells de les agulles en introduir la punta de l'agulla dins del nervi de forma inadvertida. Aquest fenomen està molts cops associat a l'aparició de parestèsies durant el procediment. Les parestèsies s'utilitzaven de manera intencionada per localitzar els nervis en la primera meitat del segle anterior⁵⁰, i actualment, malgrat l'ús de tècniques de neuroestimulació i ecografia, no s'ha aconseguit evitar per complet l'aparició de parestèsies no intencionades, malgrat que inicialment es va pensar que l'ecografia les podria evitar. Un ecògraf permet identificar els teixits i la punta de l'agulla si el pla del tall ecogràfic coincideix amb la visualització de tota l'extensió de l'agulla (imatge ecogràfica en el pla). Tanmateix, un lleuger canvi de l'angle, en moltes ocasions passat per alt, fa que no s'identifiqui exactament l'extrem real de l'agulla. El mateix succeeix, inclús de forma més marcada, si s'utilitza la tècnica de localització ecogràfica fora del pla. En no poder identificar la punta de l'agulla, augmenta la possibilitat d'aparició de la parestèsia, i també el risc de produir una punció inadvertida amb el bisell de l'agulla.

La segona causa de LNP proposada és la isquèmica. Circumstància que es podria produir en el cas d'una injecció intraneural amb o sense l'ús de vasoconstrictors; tot i que l'efecte afegit dels vasoconstrictors injectats a prop dels axons podria tenir un efecte deleteri. També podria atribuir-se a la pressió sostinguda sobre els capil·lars localitzats dins dels fascicles. Aquesta eventualitat es produiria per l'augment de la pressió intrafascicular després d'una injecció intraneural, afectant els fascicles compresos dins de l'àrea de l'orifici de l'agulla i, per tant, no tots els fascicles es veurien afectats. Revisant els estudis del mesurament de la pressió

durant la injecció intra i extraneural s'observa un pic de pressió en el moment de la injecció que als pocs segons disminueix considerablement.

Considerant la pressió que exerceix un manegot d'Esmarch en el bloqueig anestèsic intravenós de Bier durant un període de 1,5 hores, que és el màxim període tolerat pel nervi sense alteracions neurològiques futures, la pressió generada dins del fascicle d'un nervi per una injecció intraneural intrafascicular seria molt breu per considerar-la causa d'una complicació neurològica. La caiguda de la pressió intrafascicular es deu al desplaçament de la solució cap a les zones més proximals i distals dintre del propi fascicle.

La tercera causa s'atribueix a l'efecte neurotòxic dels anestèsics locals, en relació amb diversos factors com la dosi, temps d'exposició o per les propietats químiques de cada molècula. L'efecte químic directe de la substància injectada pot provocar reaccions inflamatòries que afavoreixen el desenvolupament de fibrosi al voltant del nervi⁵¹. Estudis experimentals en animals han demostrat que tots els anestèsics locals dels que disposem (lidocaïna, mepivacaïna, bupivacaïna, prilocaïna i procaïna) poden provocar neurotoxicitat en forma de canvis en el creixement de cons i neurites i de dany tissular. La concentració d'anestèsic local administrada té importància ja que es va demostrar que a concentracions baixes es produïa un grau de regeneració neuronal que no es produïa en el cas d'altres concentracions⁵². De tota manera, la mateixa substància administrada en diferents condicions pot provocar diferents efectes tòxics i diferents graus de lesió nerviosa⁵². Per aquestes raons, les lesions nervioses produïdes després de les injeccions intraneurals, estarien més relacionades amb l'efecte tòxic de la solució injectada més que amb els canvis de pressió. Cal assenyalar que les injeccions intraneurals extrafasciculars no es van poder associar amb lesions neurològiques i els resultats dels estudis electrofisiològics realitzats posteriorment van ser normals. No obstant això, les complicacions neurològiques s'han relacionat fins ara amb una distribució intrafascicular de la solució injectada. Actualment existeixen diverses hipòtesis sobre les injeccions intraneurals, basades en diferents estudis realitzats en models animals i on la solució injectada es va marcar amb blau de metilè en els estudis macroscòpics i amb tinta xinesa en els microscòpics. Aquests estudis suposen un

Introducció

avenç, però no responen algunes preguntes en intentar analitzar amb major detall la injecció intraneural.

Un altre aspecte a tenir en compte són les lesions produïdes o afavorides per una patologia vascular, on es succeeixen fenòmens d'isquèmia, obliteració de les artèries del vasa nervorum o hemorràgia en les beines nervioses⁵³. Els mecanismes vasculars poden induir canvis en la permeabilitat dels vasos epineurals o inclús edema i hemorràgia intrafascicular. Aquests canvis poden afavorir un entorn hipòxic nociu per al nervi i si no es restableix la circulació de manera precoç, el fenomen isquèmic promou la degeneració wal·leriana. Tanmateix, els mecanismes de reperfusió també poden suposar un dany afegit al nervi atesa la complexitat de les seves característiques (involucren enzims, lípids de membrana, receptors específics i altres)⁵⁴. El propi edema i hemorràgia poden ocasionar compressió i disrupció axonal^{53,55}. Cal mencionar el cas especial de la síndrome de Volkmann o contractura isquèmica.

En conclusió, les LNP postinjecció són multifactorials i poden estar ocasionades pel tipus del bisell i mida de l'agulla, l'acció mecànica o tòxica de la solució injectada, la pressió exercida i el lloc de l'administració (extraneural, intraneural, interfascicular o intrafascicular)⁴⁶.

1.2.2 Classificació general de les lesions nervioses.

Durant la Segona Guerra Mundial, Herbert Robert Seddon (1887-1964) va classificar les lesions nervioses en el seu treball "Three Types of Nerve Injury", que fou revolucionari ja que va ser el primer en realitzar una classificació en 3 categories de les lesions nervioses traumàtiques, basant-se en els components anatòmics específics del nervi, és a dir, en l'extensió de la lesió als axons i als teixits de revestiment⁵⁶ (Figura 8). Aquesta classificació va suposar un avenç important en el tractament i pronòstic d'aquestes lesions³.

Actualment, segueix sent la més acceptada i l'enumerarem de menor a major afectació (Figura 8):

1. **Neuroapràxia:** consisteix en una desmielinització local i una fragmentació de la beina de mielina, però amb una preservació anatòmica de tots els components del nervi inclòs l'axó. No apareix el fenomen de degeneració wal·leriana. Es produeix típicament en les lesions per compressió i s'afecten les fibres de major calibre (motores i propioreceptives), amb la qual cosa es produeix una mínima alteració sensitiva i simpàtica. La recuperació és espontània entre 17-60 dies i no requereix intervenció quirúrgica⁵⁷.
2. **Axonotmesi:** existeix una interrupció total dels axons i les beines de mielina però l'estroma està conservat, amb la qual cosa es manté la forma anatòmica del nervi. Una vegada instaurada la lesió, s'origina una degeneració wal·leriana distal a l'àrea de la lesió. És el típic mecanisme de lesió en les fractures per aixafament. Atès que es manté la integritat de les cobertures col·làgenes que serviran de guia per a la regeneració axonal, el pronòstic sol ser bo, dependent del grau de desorganització i distància a l'òrgan diana, ja que pot tenir lloc la regeneració espontània⁵⁸.
3. **Neurotmesi:** es defineix com la secció completa entre els dos segments del nervi afectat. El dany estructural dels axons i estroma és tant considerable que la regeneració espontània resulta impossible a causa dels importants fenòmens de cicatrització anòmala⁵⁹. Típicament es produeix en les lesions penetrants, per forces de tracció o per substàncies tòxiques.

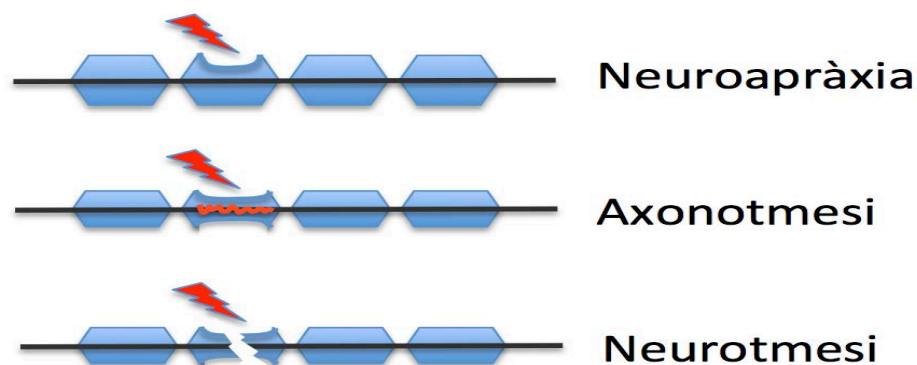


Figura 8. Classificació de les lesions nervioses segons Seddon.

Introducció

Anys més tard, Sunderland (1910-1993) va poder realitzar els seus estudis en gairebé 400 pacients amb lesió nerviosa traumàtica. Arran de les seves troballes i malgrat l'àmplia acceptació de la classificació inicial de Seddon, va subdividir l'escala en 5 graus, basant-se en distincions anatòmiques més precises encara en el seu llibre *Nerve Injuries and Their Repair: A Critical Appraisal*^{60,61} (Figura 9). Aquesta classificació era més útil des del punt de vista clínic i incloïa de menor a major gravetat:

- Lesió de primer grau: correspondria a la neuroapràxia. Existeix una interrupció fisiològica de la conducció però no apareix una degeneració wal·leriana. La pèrdua funcional és variable però afectant principalment les fibres motores. Una característica important és que la funció motora es recupera de manera simultània tant en la musculatura proximal com en la distal, el que no succeeix mai en la degeneració wal·leriana.
- Lesió de segon grau: correspondria a l'axotmesia. Existeix una interrupció fisiològica de la conducció a més d'una degeneració wal·leriana. Així i tot, es preserva el tub endoneural, facilitant la regeneració. Clínicament es presenta un dèficit neurològic complet i la recuperació dependrà dels somes neuronals afectats.
- Lesió de tercer grau: correspondria a la neurotmesia. Existeix una disrupció dels axons, de les beines i dels tubs endoneurals, però el perineuri resta intacte. Existeix una desorganització i la regeneració pot ser aberrant, per tant la funcionalitat final resulta variable. Clínicament també presenta un dèficit neurològic complet, però perdura més que les lesions de segon grau.
- Lesions de quart grau: correspondria a la neurotmesia. Existeix lesió de l'endoneuri i també dels fascicles, preservant l'epineuri i part del perineuri, de tal manera que la secció no és completa. La degeneració retrògrada resulta més evident i el pronòstic és pitjor ja que pot haver una extensa solució de continuïtat o un abundant teixit fibrós que impedeixi la correcta regeneració. Requereix intervenció quirúrgica.
- Lesió de cinquè grau: correspondria a la neurotmesia. Secció completa del nervi, sense opció de regeneració espontània, pel que la indicació quirúrgica és absoluta. Es poden presentar de manera habitual neuromes.

Finalment, MacKinnon i Dellon van afegir al 1988 un sisè grau de lesió nerviosa, al·ludint als diferents tipus de lesions i severitats que pateix el nervi al llarg de la seva extensió. En aquest cas, l'estratègia terapèutica i el pronòstic dependran de la valoració de cada una de les lesions de forma individual⁶².

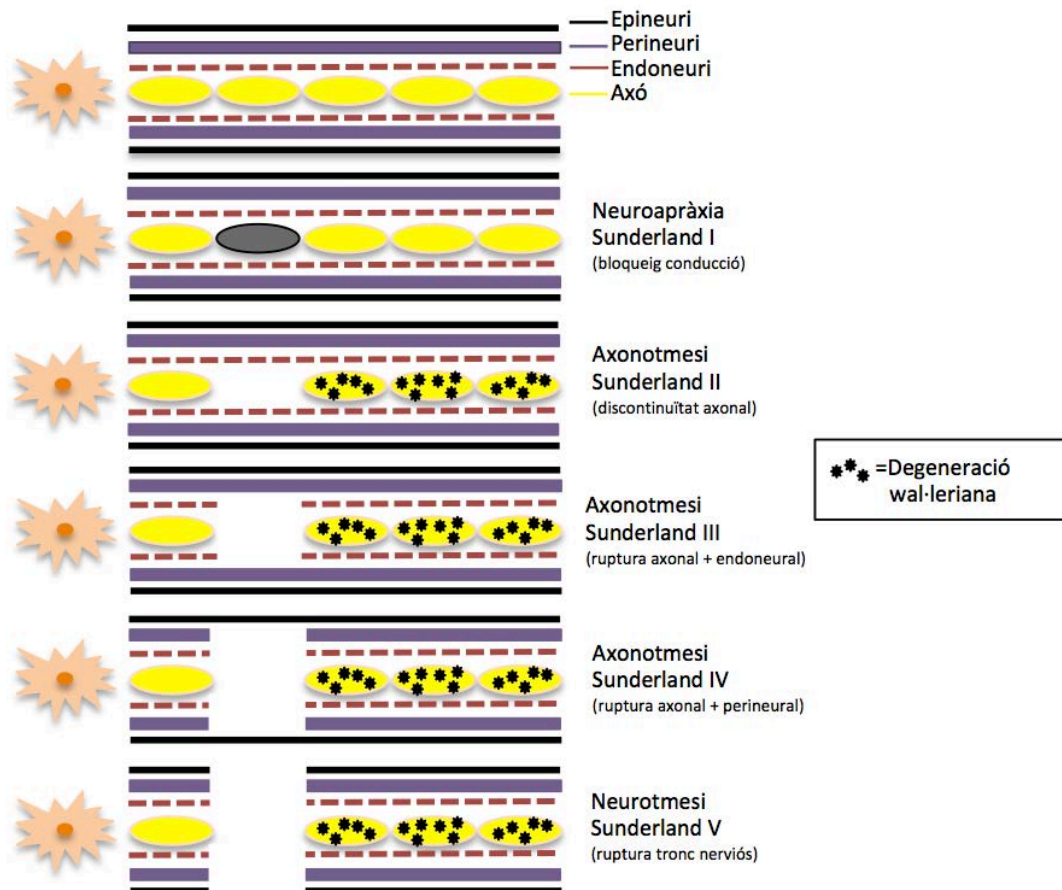


Figura 9. Classificació de les lesions nervioses segons Sunderland.

1.2.3 Fisiopatologia i mecanismes de recuperació neuronal.

En produir-se una lesió al SNP, s'activen un seguit d'esdeveniments complexos i ordenats per a la seva reparació, amb la retirada del teixit afectat i la restauració de la continuïtat de l'axó. És important destacar que en la reparació cel·lular, a diferència d'altres àrees, els nervis perifèrics no presenten mitosi, atès que el teixit afectat, l'axó, és una prolongació cel·lular que es troba bastant separada del nucli. No obstant això, donada la complexitat del procés de reparació nerviosa, el soma neuronal, localitzat en els ganglis nerviosos o dins del propi SNC, es veu involucrat; sobretot les cèl·lules de Schwann, els macròfags, cèl·lules de resposta inflamatòria o factors neurotròfics són de vital importància per afavorir la regeneració del nervi perifèric^{49,58,63}.

Tots aquests processos i la seva correlació amb una regeneració òptima dependran de la magnitud del traumatisme. Si la lesió és molt important, és probable que la recuperació sigui escassa o nul·la⁴⁹.

Existeixen dues fases en el procés de reparació d'una lesió nerviosa amb afectació axonal, que s'haurien d'entendre de manera conjunta i no com dues fases diferenciades: la fase de degeneració (supervivència neuronal) i la fase de regeneració.

a) Fase de degeneració: És la fase d'inici de la regeneració i el resultat de la recuperació nerviosa dependrà d'aquest primer procés, havent-se demostrat que davant d'una major resposta inflamatòria inicial, millor serà el pronòstic⁶⁴. Quan es produeix una secció, s'originen alteracions histològiques i metabòliques⁶⁵:

- Els cossos neuronals augmenten de mida en els següents 10-20 dies, degut a un augment del metabolisme de les proteïnes, que migraran al llarg de l'axó fins arribar a l'àrea de la lesió, on tindran un paper important en la regeneració axonal.
- A l'extrem distal de la secció, els extrems presenten una tumefacció i es separen, apareixent un coàgul sanguini enmig. A partir d'una setmana es produeix la degeneració wal·leriana, que suposa una desintegració física de l'axó i la mielina. La resta de les estructures (beina de Schwann,

estroma i vasos) resten a l'espera de la regeneració de l'axó. Així mateix, es succeeix un procés de granulació proteolítica i els macròfags inicien la fagocitació dels fragments desintegrats que s'eliminaran entre 2-3 setmanes. En 5-8 setmanes el procés total s'ha completat, quedant les beines buides a l'espera de la regeneració.

- A l'extrem proximal es succeeix la degeneració traumàtica, que seria l'equivalent de la walleriana però limitada als mil·límetres al voltant de la secció. Afortunadament, aquesta degradació retrògrada és mínima⁶⁶.
- Per tant, cal esmentar que tant en l'extrem proximal com en el distal es produeixen processos degeneratius⁶⁷.
- Alteracions musculars i de la placa motriu. En les primeres setmanes, minven de manera notable les fibres musculars i s'origina una atròfia muscular que abocarà a una substitució del múscul per greix i teixit fibrós. Si no sobrevé la innervació al cap dels 6-12 mesos la placa motriu pot desaparèixer totalment.

b) Fase de regeneració: entre els 2-7 dies, quan ja s'han eliminat tots els detritus, s'inicia el procés de regeneració en el segment proximal, expandint-se cap al distal⁵⁸. La taxa de regeneració estimada és de 1mm/dia en els humans⁶⁸.

La desmielinització es veu contrarestada per una progressiva reconstitució de la beina mielínica. El grau de regeneració es correlaciona directament amb la recuperació funcional, però no disposem encara de tècniques no invasives per a l'avaluació de la remielinització axonal, malgrat que en l'última dècada s'han realitzat diversos estudis en aquesta línia experimental^{69,70}.

A nivell intraneural també s'evidencien els fenòmens lesius i de posterior reparació nerviosa: aprimament de l'epineuri, fenòmens de fasciculació, proliferació i diferents graus de fibrosi, depenent de la importància de la lesió⁷¹.

Quan es produeix una secció nerviosa total i es practica una sutura primària, l'establiment del pont d'unió entre els dos extrems seccionats promou que proliferin les cèl·lules de Schwann i els fibroblasts. L'axó en la part proximal emet branques o neurofibril·les que utilitzen aquests ponts per avançar cap a l'extrem distal gràcies al neurotropisme⁴⁶. Encara que després de practicar una sutura

Introducció

precisa el nervi es regeneri, no recupera el seu aspecte inicial, sinó que presenta alteracions morfològiques i funcionals. Si la separació entre els dos extrems és massa important perquè la regeneració sigui possible, es produeix una regeneració anormal en la que les cèl·lules de Schwann proliferen de manera descontrolada, i en l'extrem distal els axons no participen del procés i no és possible recuperar la funcionalitat⁶⁵.

En el cas extrem d'una denervació d'un òrgan terminal, la reinnervació es pot produir mitjançant dos mecanismes, o bé per la ramificació col·lateral dels axons intactes o bé per la pròpia regeneració dels axons lesionats. El fet que es produeixi un o altre mecanisme dependrà de la proporció dels axons danyats; es considera que en lesions amb afectació del 20-30% dels axons, el mecanisme que tindrà lloc serà el de la ramificació col·lateral⁷².

Els fenòmens de plasticitat i reorganització dels circuits cerebrals que segueixen a una lesió perifèrica poden ocasionar símptomes disfuncionals com dolor, disestèsia, hiperreflèxia o distonia^{73,74}.

En el procés de regeneració axonal, cal esmentar la formació dels neuromes, que són el resultat d'una regeneració anormal. Malgrat que la gran majoria són asimptomàtics, poden arribar a produir clínica molt incapacitant de dolor neuropàtic (nervis sensitius) o la pèrdua de la funció motora (nervis motors)⁷⁵. La proliferació exagerada i desorganitzada dels axons juntament amb la formació de teixit cicatricial per part dels fibroblasts ocasiona la formació d'un neuroma que conté totes les capes del nervi en el seu interior i el fa diferenciable d'altres tipus de tumors del SNP^{76,77}.

1.2.4 Clínica de les lesions nervioses.

Atès que la majoria dels nervis són del tipus mixt, la clínica es pot manifestar tant en els components aferents (sensitiu), com en els eferents (motor i autonòmic)⁶⁷.

La LNP no ocasiona únicament la pèrdua d'informació sensorial sinó que a més produeix canvis en els circuits neuronals a nivell de la medul·la espinal, amb alteracions que romanen durant temps en les funcions somatosensorials de la columna vertebral i el desenvolupament de símptomes com parestèsia, hipoestèsia, hiperestèsia i alodínia, englobats dins del dolor neuropàtic⁷⁸.

La LNP pot manifestar-se de diferents maneres segons el tipus de lesió⁶⁰:

1. Alteració motora: en patir una secció nerviosa, es perd tota l'activitat motora distal de la zona de la lesió. Es manifesta en forma de parèsia o paràlisi dels músculs afectats, debilitat i atròfia muscular. Tanmateix, no es fa evident en l'electromiografia fins als 8-14 dies posteriors. L'atròfia s'inicia a les 2-4 setmanes i als 2 mesos es pot presentar en un 50-70% dels casos.
2. Alteracions sensitives: en seccionar-se un nervi, únicament existeix una àrea delimitada de pèrdua total de la sensibilitat, que correspon al territori del nervi lesionat (zona autònoma o aïllada). No obstant això, existeix una àrea més extensa d'anestèsia tàctil i tèrmica que correspon a la distribució anatòmica del nervi (zona intermèdia). La zona autònoma es redueix en els primers dies, inclús abans que s'hagi produït una regeneració.
3. Alteració simpàtica: la secció del nervi origina una pèrdua completa de l'activitat provocant una resposta de pèrdua de sudoració i resposta pilomatosa que ocasiona una àrea d'anhidrosi. Inicialment pot haver una vasodilatació que cedeix a les 2-3 setmanes, apareixent una cianosi i fredor de la pell. S'acompanya d'alteracions tròfiques: pell fina, brillant i fràgil.

1.2.5 Diagnòstic de les lesions nervioses.

És indispensable disposar d'un ampli coneixement de l'anatomia humana i de la trajectòria del nervi en qüestió. Tanmateix, és important conèixer l'origen de les seves branques i els músculs que innerva.

Inicialment, es requereix una anamnesi completa insistint especialment en el mecanisme lesiu i el temps d'evolució i procedir amb una exploració clínica exhaustiva (de distal a proximal), cercant els signes i símptomes motors, sensitius i vegetatius⁷⁹.

És fonamental el coneixement de la distribució dels territoris innervats exclusivament per aquest nervi i de les zones de superposició dels nervis veïns.

- La sensibilitat tàctil s'explora amb l'ús d'un cotó, i la dolorosa amb una punxada suau amb una agulla.
- D'altra banda, la sensibilitat epicrítica o discriminatòria es valora amb el Test de Weber-Möberg (distància mínima en mil·límetres en que el pacient percep dues puntes romes) o amb el Test d'Estereognòsia (reconeixement per tacte d'objectes comuns sense utilitzar la vista)⁶⁰.
- El signe de Tinel-Hoffman es realitza percutint amb suavitat sobre el trajecte del nervi lesionat. En el cas que sigui positiu, apareixen parestèsies en el trajecte del nervi, però no en la zona percutida, que persisteixen durant uns segons. La seva interpretació implica que el tub endoneural està avançant (axons en regeneració), però no és indicatiu de regeneració completa del nervi⁸⁰.
- Avaluació clínica de la força muscular: es valora mitjançant una escala de 6 ítems. El "0" indica paràlisi total i el "5" contracció normal comparativament amb el costat oposat.

L'exploració electromiogràfica (EMG), és una exploració bàsica i necessària per a tipificar les lesions nervioses, i permet diferenciar entre lesions preganglionars i post i localitzar la zona lesionada en el trajecte del nervi. També aporta informació dels processos de denervació i reinnervació⁸¹⁻⁸³. Tal i com s'ha comentat anteriorment, és normal just després de la lesió. A partir de la 1a-2a setmana

apareixen signes d'envorjació i no s'evidencien potencials d'activitat en intentar la contracció del múscul. Indica si existeix afectació del múscul però no el nivell lesiu del nervi, motiu pel qual, s'haurien d'avaluar tots els músculs innervats pel mateix nervi. La realització d'EMG seriats podria detectar una reinnervació, però sempre s'advoca per la seva corroboració mitjançant l'exploració física.

1.2.6 Tractament quirúrgic del nervi perifèric.

S'han realitzat grans avenços en el camp de la reparació nerviosa, i tots els experts coincideixen en que un coneixement ampli de la base fisiopatològica és fonamental per aconseguir uns resultats funcionals òptims⁸⁴. A més, uns altres factors com són el mecanisme, el temps d'evolució, la gravetat i magnitud de la lesió, l'anatomia i realineació dels fascicles, les característiques pròpies de cada pacient, l'estrès psicològic inicial i l'habilitat i tècnica quirúrgica del cirurgià són bàsics per a una millor recuperació funcional⁸⁵⁻⁸⁷.

Malgrat això, actualment la majoria de les lesions nervioses reparades aconseguixen una funcionalitat incompleta, evidenciant la necessitat de perseverar en les línies d'investigació⁸⁴.

1.3 Ecografia en el nervi perifèric.

Actualment, malgrat els grans processos tecnològics en l'entorn mèdic, únicament la ressonància magnètica nuclear i l'ecografia són capaces d'obtenir imatges útils del SNP amb finalitat diagnòstica i contribuir a la realització de bloquejos anestèsics o tècniques terapèutiques. Totes dues són tècniques no ionitzants, però l'ecografia destaca per diferents motius: millor tolerància per part del pacient, portabilitat, menor despesa econòmica i millor qualitat d'imatge en estructures anatòmiques molt superficials^{88,89}.

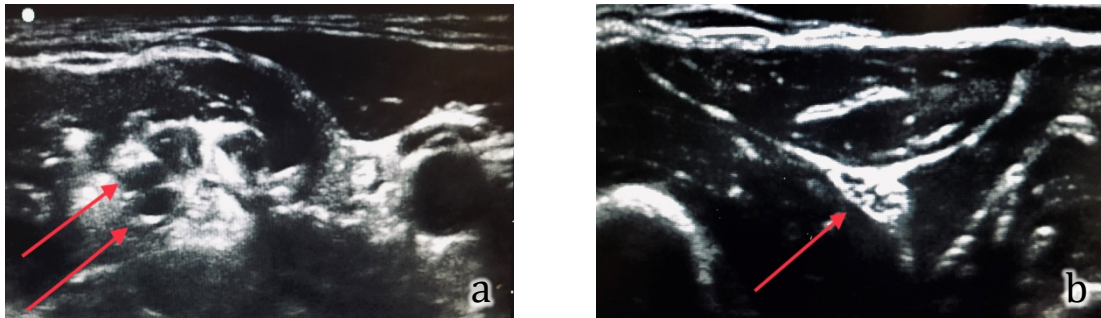
També cal destacar que a part de l'ús diagnòstic de l'ecografia mitjançant exploracions dinàmiques⁹⁰, presenta una finalitat terapèutica ja que permet la realització de procediments en diferents àmbits sanitaris, a diferència de la ressonància magnètica nuclear.

Els teixits presenten imatges ecogràfiques definides depenent de si estan indemnes o lesionats. En el cas d'una lesió nerviosa, es poden observar patrons de disrupció o disminució de l'ecogenicitat, augment de la mida nerviosa, alteració de la vasculatura, imatges anecoïques (per l'aparició de líquid o sang en la lesió) o neuromes. Mentre que les seccions traumàtiques completes del nervi poden ser fàcilment detectables per l'ecografia, el diagnòstic de les seccions incompletes podria ser menys precís^{88,91}.

Fa més de 3 dècades que es va començar a estudiar, tant en subjectes sans com en pacients i cadàvers, l'ús de l'ecografia en el diagnòstic de les patologies del nervi perifèric^{92,93}. Més recentment, l'ecografia s'ha utilitzat per establir correspondències entre mides i característiques morfològiques dels pacients⁹⁴.

Si es té en compte l'estructura del nervi perifèric, es podria dividir en teixit interfascicular i fascicles nerviosos. L'aparença del nervi dependrà de molts factors, però sobretot s'ha de tenir en compte la relació de teixit neural (fascicles) i no neural (teixit interfascicular), que varia àmpliament, com s'ha comentat prèviament, sent major en les zones proximals. En termes generals, es pot dir que les estructures axonals es mostren més fosques, hipoecogèniques, mentre que l'epineuri serà més clar, hiperecogènic⁸⁸. Per aquest motiu, si s'estudia una zona molt proximal del nervi com les arrels nervioses (més teixit fascicular), les imatges

seran més hipocogèniques i en les zones més distals, on preval el teixit no neural, els nervis perifèrics presentaran la típica estructura de “bresca d’abella” (Fotografia 8). De la mateixa manera, Suk va descriure un augment d’ecogenicitat en les àrees proximals a les ramificacions nervioses i en les zones d’encreuament de les articulacions com el nervi medià o cubital en l’avantbraç⁹⁵.



Fotografia 8. Imatges ecogràfiques nervioses. a: arrels nervioses cervicals, b: nervi cubital a l'avantbraç.

Entre les aplicacions de l’ecografia, es va poder validar un mètode quantitatiu per a la mesura de l’àrea de la secció transversal (CSA, per les seves sigles en anglès) dels nervis perifèrics de l’humà, demostrant que existia una bona reproductibilitat intra i inter-observador tant en cadàvers com en voluntaris. Cal tenir en compte que els valors establerts per a cada nervi al llarg del seu trajecte estan poc influenciats per variables com el sexe, pes, alçada, però sí per l’edat^{94,96-99}.

De tota manera, l’ecografia segueix tenint limitacions que depenen tant de les característiques tècniques dels equips disponibles com del propi operador.

1.3.1 Anestèsia regional ecoguiada (USRA).

De tots els beneficis anteriorment esmentats, l'aplicació més estesa de l'ecografia del nervi perifèric és la de l'anestèsia regional ecoguiada⁸⁸, tal i com es reflecteix en la majoria de publicacions científiques dels darrers anys.

Malgrat que no existeixen estudis rigorosos sobre la seguretat de l'ús de l'ecografia durant l'anestèsia regional, és indubtable que la visualització en temps real comporta molts beneficis, com l'observació de l'estructura diana i circumdants per tal d'evitar la punció d'altres estructures, control del progrés de l'agulla o la detecció de variants anatòmiques; per aquest motiu, s'ha convertit en la tècnica *gold standard* "no declarada" de localització nerviosa en l'anestèsia regional⁸⁸.

Malgrat això, el seu primer ús al 1978 no fou per a la localització nerviosa, sinó per detectar estructures confrontants mitjançant l'ús del Doppler, i d'aquesta manera evitar la punció del vasos durant la tècnica d'anestèsia regional del plexe braquial. Quinze anys més tard es va comunicar la primera utilització d'USRA per Kapral^{100,101}. D'ençà, el seu ús s'ha anat imposant i ha permès el ressorgiment d'antics debats d'important rellevància clínica com les possibles injeccions intraneurals i el seu dany potencial inherent.

Tradicionalment, sempre s'ha evitat la realització d'injeccions intraneurals per la creença que produïen un dany nerviós directe amb lesions irreversibles. Malgrat no existir estudis sistemàtics que donin suport a aquest concepte, aquest ha estat el dogma transmès dins de l'anestesiologia durant les darreres dècades. De tota manera, en revisar la història, el Dr. Pauchet, reconegut cirurgià francès, fou dels primers a realitzar infiltracions intraneural amb injecció de cocaïna per a:

"abolir la sensibilitat d'un camp operatori infiltrant a distància els nervis o els troncs nerviosos que innerven aquella zona operatòria... és necessari el coneixement de l'anatomia i reconèixer la innervació sensitiva, cutània i profunda dels nervis que són fàcilment accessibles a distància del camp operatori".

Així mateix, també definí el que succeïa després de la infiltració:

“es produeix un engrandiment fusiforme del nervi que desapareix ràpidament. La substància injectada es difon al llarg d’ambdós costats, motiu pel qual una injecció intraneural pot eixir a través de les rames que deixen el nervi a prop del lloc de la injecció”¹⁰².

Aquests fets evidenciats *de visu*, s’han pogut corroborar amb l’ecografia en model animal porcí¹⁰³⁻¹⁰⁵ i en humana^{106,107}, encara que ja s’insinua que aquests canvis morfològics no han d’anar necessàriament acompanyats d’una lesió nerviosa.

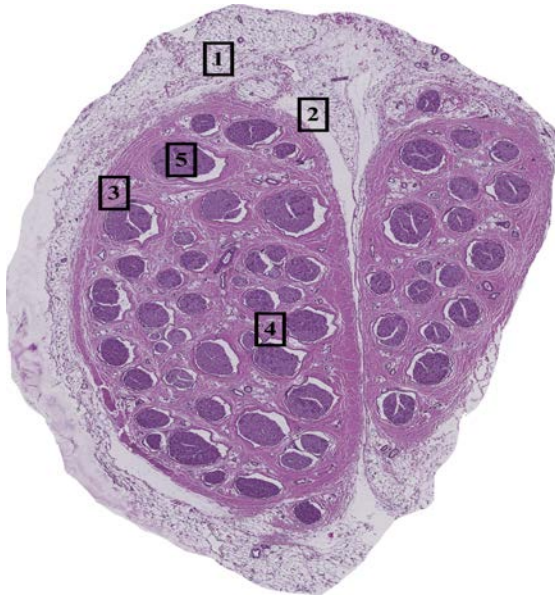
L’estructura anatòmica del nervi i les seves diferents capes histològiques tenen una especial rellevància atès que delimiten diferents compartiments on teòricament podria depositar-se l’anestèsic local durant una anestèsia regional (Fotografia 9)⁸⁸:

1. Extraneural (1): es realitza la injecció fora de la membrana epineural. És una injecció segura, habitualment presenta una absència de resposta de neuroestimulació a baixa intensitat. No hi ha resposta per valors inferiors a 0,4 mA. L’inici del bloqueig anestèsic és d’instauració lenta i habitualment requereix una reorientació de l’agulla ja que el líquid administrat es pot distribuir de forma no prevista.
2. Epineural: la injecció es localitza dins de l’epineuri i fora del perineuri, o sigui, fora del fascicle. Dins d’aquest grup existeixen diferents subgrups:
 - a. Injecció entre branques o interneural (2): entre nervis o troncs que estan envoltats del mateix teixit epineural. Per exemple, el bloqueig en el nervi ciàtic o en el plexe braquial. Es produeix una distribució del líquid al voltant del grup de nervis o troncs dins del mateix grup. També se segueix considerant una injecció segura amb resposta de neuroestimulació habitualment entre 0,5 i 1 mA amb baixa resistència a la injecció. Actualment es qüestiona que aquest tipus d’injecció es localitzi dins de l’epineuri. Aquesta denominació no és més que una errada terminològica suportada pels que han definit l’epineuri com la suma de l’epineuri més el teixit gras interfascicular. A més, alguns autors ja consideren que l’epineuri del nervi ciàtic no és més que el primer nivell del circumneuri que envolta a dos nervis, que són pròpiament els

nervis tibial i peroneo comú i, per tant, aquest tipus d'injecció per dins del nervi ciàtic però per fora d'aquests nervis, no fóra intraneural sinó extraneural. Aquesta discussió només s'aplica al nervi ciàtic.

- b. Injecció subepineural (3): es produeix per sota de la membrana epineural en un únic nervi. La resposta de neuroestimulació està present en valors propers a 0,5 mA. L'anestèsic injectat es distribueix al llarg del nervi pel compartiment gras localitzat entre els fascicles, i no es limita a una distribució subepineural exclusivament. S'associa amb un baix risc neurològic.
- c. Injecció intraepineural o interfascicular (4): la injecció es localitza enmig del nervi, però per fora dels fascicles o grups fasciculars. La punta de l'agulla s'introdueix més profundament que en l'opció anterior, però sempre dins del compartiment gras que hi ha entre els fascicles. Es poden presentar parestèsies i resposta motora a una intensitat de 0,5 i 0,3 mA. Ecogràficament s'observa una inflamació dels grups fasciculars i del nervi, coneguda com *swelling*, i l'ecogenicitat del nervi variarà. Aquest tipus d'injecció es relaciona amb un risc d'alteració funcional, encara que aquesta possibilitat és baixa. En l'actualitat es recomana evitar-la fins que no es disposin de més estudis. La distribució de la solució intraneural en direcció proximal i distal és similar a la injecció subepineural. En realitat, existeix molt poca diferència funcional entre la injecció subepineural i la injecció interfascicular. Ambdues són injectades dins de l'epineuri i fora del perineuri, i la solució es distribueix entre els fascicles. L'única diferència és la profunditat d'inserció de l'agulla dins del nervi. La injecció subepineural és més superficial, immediatament per sota de l'epineuri, mentre que en la injecció interfascicular la punta de l'agulla es situa més profundament i amb una major possibilitat de lesionar algun fascicle.
- d. Intrafascicular (5): la injecció es realitza dintre del propi fascicle i és poc freqüent amb comparació amb la resta d'injeccions, atès que clínicament el dolor és molt important i la lesió del nervi és inevitable. Es presenta una resistència alta a la injecció i la resposta motora es produeix amb una mínima intensitat de neuroestimulació. La imatge

ecogràfica és la mateixa que en la dels dos casos anteriors, ja que actualment l'ecògraf no disposa d'una resolució suficient per a diferenciar l'inflament dels fascicles i l'inflament del nervi en general.



Fotografia 9. Possibles localitzacions de l'agulla en el nervi ciàtic porcí.

1: extraneural, 2: subepineural (plexe braquial o nervi ciàtic), 3: subepineural (nervi únic), 4: intraepineural (entre grups de fascicles), 5: intrafascicular (dins d'un fascicle).

Resumint, disposem de diverses imatges ecogràfiques que ens fan pressuposar una injecció intraneural, i aquests criteris es poden dividir en majors o menors¹⁰⁶:

- Criteris Majors:
 - Visualització de l'agulla dins del nervi.
 - Augment del CSA (comparació prèvia i durant la injecció).
- Criteris Menors:
 - Reducció elàstica de l'àrea intraneural en cedir la injecció.
 - Inflament del nervi, canvi d'ecogenicitat.
 - Distribució al llarg de les divisions del nervi.

Així i tot, el risc de lesió nerviosa dependrà de diversos factors, i el propi nervi disposa de diferents mecanismes de protecció com la disposició i conformació del nervi (relació entre el teixit no neural i neural), la mida dels fascicles i grups fasciculars, l'elasticitat i capacitat d'elongació dels fascicles i la vascularització neural. També té una importància especial en la lesió nerviosa associada a la USRA, el disseny de l'agulla i el bisell, la força de la injecció i el tipus i la concentració de l'anestèsic local⁸⁸.

1.4 Tècniques de microscòpia i motius per a l'elecció de la tècnica usada.

L'elecció d'un microscopi òptic o electrònic dependrà de les característiques de l'element a estudiar i també del grau de detall de les estructures que es pretenen visualitzar per tal de poder respondre als objectius plantejats (Figura 10):

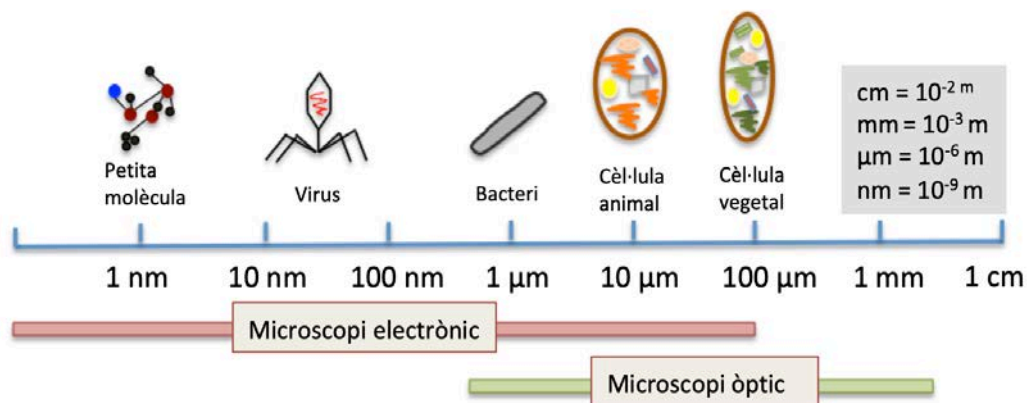


Figura 10. Rang de mides observables per microscòpia.

Hi ha diferents tipus de microscopis, però la selecció del microscopi dependrà dels nostres objectius, i aquests no sempre són aconseguir la major potència de visualització microscòpica: tot depèn de si el nostre objectiu és estudiar les característiques d'un bosc, d'un arbre, d'una fulla de l'arbre o de la ultraestructura de la fulla.

1.4.1 Microscòpia òptica (MO).

El microscopi òptic o microscopi de llum es basa en un conjunt de lents i elements de manipulació de la llum (fotons) per produir una imatge augmentada. Inclou un focus o font de llum (que és l'encarregat de dirigir els raigs de llum cap a la mostra), lent condensadora (concentra els rajos sobre la mostra), l'objectiu (conjunt de lents que reben la llum) i l'ocular (amplia la imatge) (Figura 11):

Normalment arriben als 1.000 augments i el límit ve marcat pel poder de resolució, que seria la capacitat de distingir dos punts adjacents com diferents i separats.

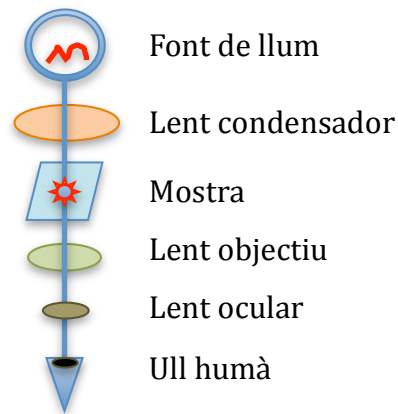


Figura 11. Esquema dels components de la microscòpia òptica.



Fotografia 10. Microscopi òptic.

1.4.2 Microscòpia electrònica.

El funcionament d'aquest tipus de microscopis es basa en utilitzar electrons en comptes de llum visible. En termes de principis físics, cal recordar que la longitud

Introducció

d'ona amb la qual es desplaça un electró és inversament proporcional a la seva velocitat. D'aquesta manera, si accelerem els electrons a altes velocitats, aconseguirem unes longituds d'ona molt curtes. Els electrons accelerats impacten amb una mostra i alguns la travessen i altres són reflectits; a partir de la detecció d'electrons es pot reconstruir una imatge de la mostra observada.

Existeixen dos tipus diferents de microscòpia electrònica:

- De transmissió (TEM: Transmission Electron Microscopy)
- De rastreig o escombratge (SEM: Scanning Electron Microscopy)

1.4.2.1 *Microscòpia electrònica de transmissió (TEM).*

Projecta els electrons a través de mostres de teixit produint una imatge en 2 dimensions sobre una pantalla fosforescent. La TEM depèn dels electrons que travessen la mostra i, per aquest motiu, requereix que el tall histològic sigui molt fi; la brillantor de la imatge és proporcional al nombre d'electrons que es transmeten a través de la mostra. És el microscopi que aconseguix major resolució (Figura 12). Aquest microscopi permet l'estudi de les estructures internes de la cèl·lula, i depenent de l'equip, es poden obtenir imatges a grans augments i amb alta resolució aconseguint imatges per sobre de 100.000 augments.

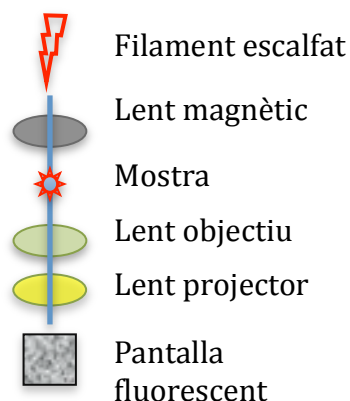


Figura 12. Esquema dels components de la microscòpia electrònica de transmissió.



Fotografia 11. Microscopi electrònic de transmissió.

1.4.2.2 Microscòpia electrònica de rastreig (SEM).

Aquest instrument és capaç d'oferir un rang d'informacions procedent de la superfície de la mostra i genera una imatge en 3 dimensions. El gruix o mida de la mostra és indiferent atès que els electrons incideixen des de dalt i donen una imatge de superfície. Es basa en l'acció "d'escombrar" un feix d'electrons sobre una imatge mentre en un monitor es pot anar visualitzant depenent de la funció que s'hagi seleccionat. Hi ha diferents variants però, de manera general, el detector d'electrons secundaris és el senyal més adequat per a l'observació de la mostra pel fet que és el que aporta més resolució¹⁰⁸ (Figura 13). Depenent de l'equip es poden obtenir imatges a grans augments i amb alta resolució arribant també als 100.000 augments.

Introducció

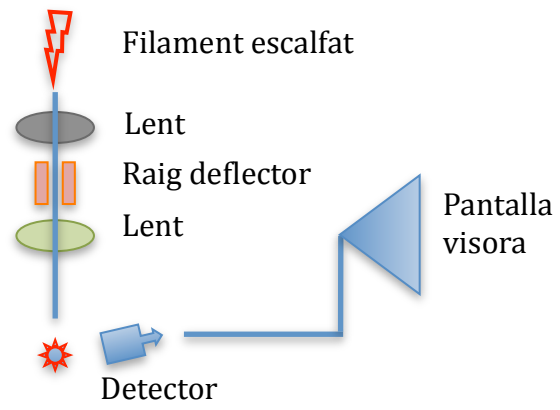


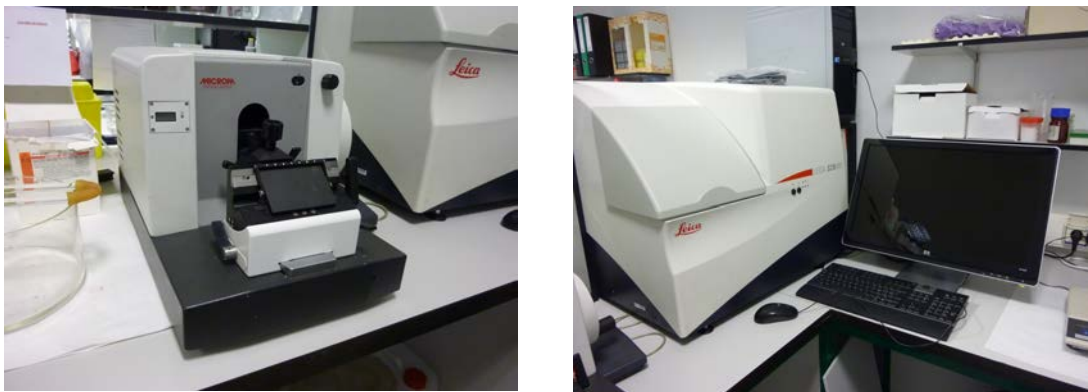
Figura 13. Esquema dels components de la microscòpia electrònica de rastreig.



Fotografia 12. Microscopi electrònic de rastreig.

1.4.3 Microscòpia òptica de mostres àmplies.

La microscòpia òptica, com s'ha descrit anteriorment, permet l'estudi de les estructures que entren dins del camp visual del microscopi. Aquest camp és més gran a baixos augments i disminueix proporcionalment si incrementem el nombre d'augments. Per aquesta raó, si el nostre interès és treballar a alts augments, un camp de visió reduït, si bé permet l'estudi d'una petita porció de la mostra, limita la interpretació de la mostra completa. Hi ha sistemes de captura d'imatges motoritzats (escàner de microscopis) que capturen les successives imatges dels camps de visió de la mostra sota del microscopi i, a través d'un programa habitualment dissenyat pel mateix fabricant del microscopi, es fa una captura completa de tota la mostra a alts augments. Acabat l'escanejat de la mostra, és possible visualitzar-la en un ordinador i sense necessitat de l'ús d'un microscopi mantenint totes les propietats microscòpiques originals. Aquestes imatges poden ser processades a través de programes de processament d'imatge i aconseguir una imatge única amb capacitat d'expandir-se, incrementar el seu augment segons es desitgi fins a aconseguir l'augment màxim que s'havia obtingut originalment en el microscopi. Aquesta tècnica permet explorar grans mostres a màxims augments i alta resolució. Una cosa similar a explorar una ciutat amb un satèl·lit, veient els detalls de totes les cases simultàniament.



Fotografia 13. Microscopi òptic de mostres àmplies.

1.4.4 Elecció de la tècnica microscòpica.

El grup de recerca al qual pertany la doctoranda porta dues dècades estudiant els nervis i les possibles lesions nervioses que es poden produir després de realitzar tècniques d'anestèsia regional. Al principi es van iniciar els estudis amb microscòpia òptica, més tard amb microscòpia electrònica de transmissió i finalment amb microscòpia electrònica de rastreig. Ja coneguts tots els detalls ultraestructurals dels nervis, l'objectiu actual és l'estudi d'àmplies mostres per poder comparar els patrons de les seves estructures i avaluar similituds i diferències i també identificar el destí de marcadors injectats dins del nervi. Per assolir aquest objectiu i després d'explorar diferents tècniques microscòpiques, hem triat com a tècnica la microscòpia òptica d'àmplies mostres. Aquesta tècnica ens ha permès assolir 800X augments en alta resolució, observant detalls dels axons, làmines perineurals del perineuri, epineuri, paraneuri, fascicles principals i fascicles d'interconnexió, adipòcits, vasos (inclosos capil·lars) i, per descomptat, tots els detalls dels marcadors injectats dins del nervi.

1.5 Medicina translacional.

El terme medicina translacional sorgí a principis dels anys 90, però la seva divulgació no va començar fins una dècada més tard. El concepte fa al·lusió als estudis que tenen com a finalitat anar “del laboratori al llit del pacient”. És una forma d'intentar donar continuïtat a la recerca del laboratori per a la seva aplicació a la pràctica clínica.

La necessitat de creació d'aquest terme és relativament recent, atès que fins la primera meitat del segle XX, els descobriments “preclínic” del laboratori tenien una ràpida i directa aplicació a la població. En nombroses ocasions, el propi investigador era el metge que acabava aplicant aquests progressos als pacients. Un exemple fóra el cas del Dr. Agote (1868-1954), metge argentí que va acabar descobrint i aplicant amb èxit el citrat de sodi per a evitar la coagulació de la sang i així permetre les primeres transfusions de sang¹⁰⁹. Malgrat això, posteriorment, amb el ràpid desenvolupament de la biologia molecular als anys 70, i el de les ciències bàsiques quedà a càrrec de professionals no mèdics, produint-se un evident distanciament entre les ciències bàsiques i el destinatari final: el pacient.

Als Estats Units Nord-americans (EEUU) aquesta divisió fou molt notòria, arribant a denominar-se “la vall de la mort”, una franja on no hi havia punt de trobada entre els diferents professionals. Les ciències bàsiques van progressar, incrementant-se així la literatura en les revistes de qualitat, mentre que els metges no arribaven a poder aplicar aquests avenços¹¹⁰.

En els darrers anys ha hagut un esforç mundial, amb més o menys èxit, per a intentar pal·liar aquesta situació. A Espanya, es va intentar impulsar i es van aprovar mesures per a donar suport a la col·laboració d'empreses, universitats, centres de recerca i tecnològics en projectes de recerca i desenvolupament, promovent l'ús de bones pràctiques de recerca.

En la filosofia de la medicina translacional, el model de les 4 T és el més utilitzat:

- T1: del coneixement bàsic a l'aplicació clínica potencial (coneixement teòric).
- T2: orientacions basades en l'evidència o proves (coneixement de l'eficàcia).

Introducció

- T3: intervencions clíniques (coneixement aplicat).
- T4: salut de la població (coneixement de la salut pública).

La medicina o ciència translacional utilitza els descobriments bàsics de la recerca i els transforma per poder-los aplicar en teoria tècnica, tecnologia i mètodes que concorden el laboratori i la clínica per tal de redundar en benefici de la salut.

Intenta ser una garantia per acabar implementant els èxits d'eficàcia demostrada en la població, però fóra ideal que hi hagués un recorregut bidireccional i una recollida d'informació clínica de tornada. D'aquesta manera es promou una major eficiència en el desenvolupament de noves estratègies. Aquesta eficiència es fa necessària atès l'increment de l'expectativa de vida de la població, que comporta un augment de la prevalença de patologies cròniques, augment de la despesa de l'atenció sanitària i de les malalties de recent descobriment que requereixen atenció.

Els grans progressos en innovació científica han permès un avenç exponencial els darrers anys, afavorint un ràpid desenvolupament de noves tècniques, molècules i tractaments a un cost assumible.

En el camp del desenvolupament de certes substàncies com els fàrmacs, els estudis realitzats en models animals ofereixen una excel·lent informació per a poder iniciar les proves en humans sense risc. Tanmateix, l'experimentació amb animals a la indústria farmacèutica ha disminuït en els últims anys degut a qüestions ètiques i econòmiques. En el moment actual, i per la manca d'altres models que puguin ser tan predictius com els animals, és inqüestionable la valuosa informació que es deriva d'aquests estudis¹¹¹.

En el cas concret de la medicina translacional en experimentació animal, un correcte disseny de l'estudi, així com una correcta selecció de l'espècie per aconseguir una millor correlació amb l'humà, un bon refinament i la inclusió de paràmetres de seguretat comporta una millora en la seguretat per a la seva posterior aplicació en l'humà¹¹².

Els models animals representen una valuosa eina per a desenvolupar models modificats genèticament, línies endògenes o models d'inducció de malalties, entre altres. Per a un correcte estudi es requereix la validació prèvia de les espècies

animals, per tal de poder posteriorment extrapolar-la a l'ésser humà, reduint així les taxes de fracàs¹¹³.

Tanmateix, els models animals també suposen el substrat ideal per l'estudi d'estructures anatòmiques i reproduir lesions, inclús lesions iatrogèniques provocades per actes mèdics, com es pretén posar de manifest en aquest treball.

Cal fer esment de la cèlebre frase del Premi Nobel Severo Ochoa:

“La ciencia siempre vale la pena porque sus descubrimientos, tarde o temprano, siempre se aplican”.

1.5.1 Experimentació Animal.

L'experimentació *in vivo* o experimentació animal té com a objectiu explicar fenòmens biològics o fisiològics, i està basada en l'ús d'espècies animals determinades. Es considera que és tota acció de caràcter experimental duta a terme en animals, sota una estricta regulació legislativa i realitzada per personal acreditat.

La utilització dels animals en el context biomèdic, ha aportat nombrosos beneficis a la humanitat, contribuint directament a l'increment de l'esperança de vida, l'avenç en el coneixement de les malalties i al desenvolupament de vacunes i fàrmacs. L'experimentació animal s'utilitza en àmbits molt diversos, des de l'agroalimentació a la investigació genòmica, biotecnologia o neurociència¹¹⁴.

Segons la legislació europea, és obligat comunicar i publicar la utilització d'animals en experimentació. Segons la informació estadística disponible¹¹⁵, el nombre d'animals utilitzats a Espanya ha minvat notablement en els darrers 8 anys fins arribar als 917.000 en l'actualitat. El grau de severitat dels procediments és majorment lleu (51%) o moderat (34%) i s'utilitzen en gran mesura ratolins (65%), seguit de rates i altres rosegadors. El segon grup correspondria als peixos (11%), seguit de les aus (10%), conills (3%) i porcs (1%) (Figura 14). El 75% dels animals s'utilitzen per activitats d'investigació i desenvolupament en medicina, odontologia, veterinària i estudis de biologia fonamental. A Espanya, l'objectiu experimental més freqüent és l'estudi de malalties oncològiques (41%), mentre que els estudis envers la problemàtica musculoesquelètica, dins dels que estaria el present treball, únicament representa el 0,73%¹¹⁶.

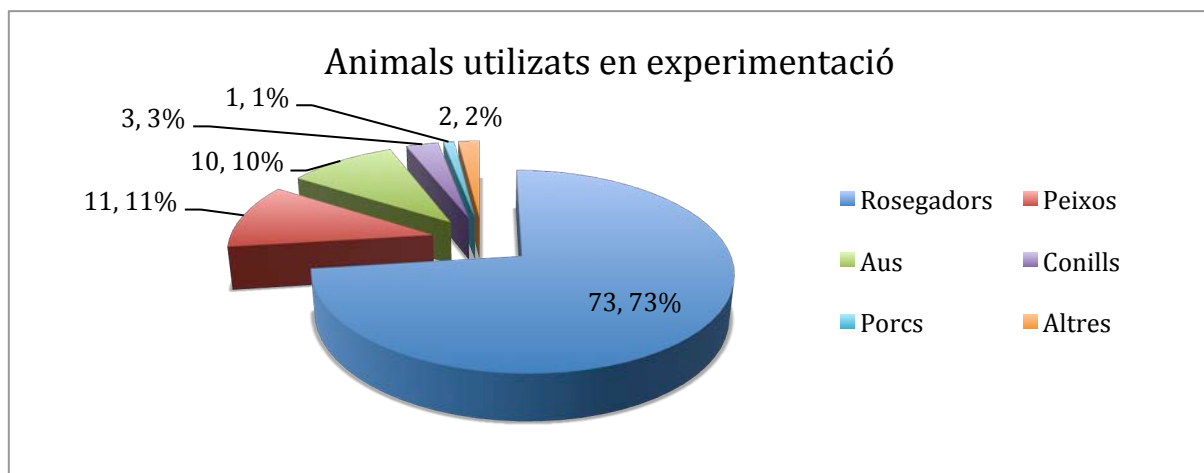


Figura 14. Animals utilitzats en experimentació.

1.5.1.1 Aspectes històrics.

L'experimentació animal, amb els seus defensors i detractors, ha estat una pràctica habitual al llarg dels diferents períodes de la història.

Els primers documents escrits que fan referència a l'experimentació animal no humana, es remunten al segle IV AC. En l'Antiga Grècia, Alcmeó i Aristòtil van realitzar els primers estudis documentats de dissecció d'animals^{117,118}, establint les bases per al futur desenvolupament de les diferents disciplines mèdiques. La concepció aristotèlica de les "tres ànimes": vegetativa, sensitiva i racional va ser el pilar per iniciar l'experimentació animal. L'ànima racional suposa la diferència entre humans i animals i precisament la carència d'aquesta ànima els converteix en sers inferiors i justifica que siguin utilitzats com "instruments" per aconseguir diferents fins. Erasístrat i Heròfil van anar un pas enllà i, malgrat els tabús existents, varen practicar les primeres viviseccions en criminals convictes, amb el vistiplau de l'àmbit científic i intel·lectual de l'època¹¹⁹. Galè, metge romà del segle II, va ser considerat el "pare de la vivisecció" pel seus experiments de dissecció en porcs i cabres vives¹¹⁹ i no tant sols va descriure l'anatomia sinó que també va interpretar una gran quantitat de funcions, com les dels pulmons i cor.

En el sentit més estricte, la vivisecció (del llatí *vivus*, viu i *sectio-onis*, tall) fa referència a l'ús d'animals vius en la cirurgia exploratòria. Malgrat això, amb el pas

dels anys i arrel de l'augment de la controvèrsia social, va passar a utilitzar-se de manera despectiva per a referir-se a l'experimentació animal.

Tanmateix, la pràctica de la vivisecció no sempre va tenir acceptació entre els erudits. La corrent empirista descartava l'estudi de la fisiologia i anatomia (tant en animal viu com en mort), per la creença que el dolor i la mort podien distorsionar els òrgans interns. Eren crítics amb els experiments previs que realment, malgrat haver suposat una millora en el coneixement, freqüentment eren incorrectes. Durant l'Edat Mitjana, i amb la progressiva cristianització d'Europa, l'estudi de l'anatomia va caure en desús, degut a una major preocupació per la vida eterna que per la terrenal, i també pel convenciment que les malalties tenien un origen sobrenatural, relacionat tot sovint amb la superstició¹²⁰.

No fou fins el Renaixement, quan Vesal, reconegut metge i cirurgià, va fer trontollar els coneixements anatòmics vigents fins el moment. Malgrat les lleis eclesiàstiques existents, realitzà disseccions il·legals de cadàvers humans, comparant-los amb altres espècies animals. D'aquesta forma va assentar els fonaments de l'anatomia comparativa actual¹²⁰.

En el segle XVII, durant l'Era de la Il·luminació, les viviseccions es van dur a terme de forma habitual, justificant la seva pràctica sense anestèsia adduint que els animals eren "màquines" i que els experiments tan sols eren "aparentment danyosos". El concepte dels animals com éssers sense ànima i sense capacitat de tenir sentiments, absolia els homes de la sospita d'estar cometent un delictes¹²¹⁻¹²³. Tanmateix, seguien existint els detractors d'aquesta pràctica: el Dr. O'Meara recalcava que "la miserable tortura de la vivisecció situa el cos en un estat no natural", argüint que es produïen alteracions fisiològiques pel propi dolor. Així mateix, en considerar als animals com una raça inferior, argumentava que els resultats no podien ser extrapolables a l'humà¹²⁴.

Robert Boyle va demostrar que l'aire era indispensable per la vida a través dels seus experiments en animals vius. Aquesta afirmació va esdevenir un dogma per a la comunitat científica europea durant les epidèmies de pesta, que consideraven que si l'aire era imprescindible per a la vida, era molt probable que totes les malalties s'originessin en aquest medi. D'aquesta manera es van dissenyar les màscares aromàtiques i es van denominar certes malalties com la malària (mal

Introducció

aire), degut a la creença que l'aire era el mitjà on es creava tot¹²⁵. Al 1665, Lower va realitzar la primera transfusió sanguínia entre gossos, obrint noves possibilitats terapèutiques als descobriments fisiològics, encara que en intentar repetir el mateix experiment, però d'un gos a un humà, el resultat fou advers.

Claude Bernard, conegut com el “príncep dels vivisectors” i pare de la fisiologia, va ser el primer en considerar que l'experimentació animal formava part del mètode científic i va plasmar en els seus escrits que considerava que:

“la ciència de la vida es un saló magnífic i enlluernador, al qual solament es pot arribar travessant una llarga i horrible cuina”.

Amb el pas dels anys, el debat social entre viviseccionistes i els antiviviseccionistes es va agreujar, sorgint la següent qüestió: *“la pregunta no és si poden raonar o parlar, sinó si poden patir”*¹²⁶. Arran de la conscienciació col·lectiva, en ple segle XIX, es va proclamar la primera Llei de Protecció Contra la Crueltat envers els Animals.

Durant els segles XIX i XX, va tenir lloc una veritable revolució en el camp experimental. Pasteur va demostrar la teoria microbiana de la malaltia induint carboncle a una ovella; Koch va descriure el bacil causant de la tuberculosi; la insulina va ser aïllada per primera vegada en gossos, i es van desenvolupar antibiòtics i vacunes per la lepra en armadillos. Pàvlov, va realitzar els seus reconeguts experiments de condicionament clàssic en animals vius, encara que segons els experts, ell mateix es qüestionava les condicions de tracte ètic amb els animals i gràcies al sorgiment de la bioètica, en aquella època es va afavorir una regulació d'aquestes pràctiques¹²⁰.

Fins a aquest moment, les lleis reguladores dels fàrmacs eren bastant laxes, i arran de tragèdies com la de la talidomida, es van aprovar lleis que obligaven a realitzar proves en animals durant el període de la gestació abans de la seva comercialització per a humans.

El camp de l'experimentació biomèdica va tenir un gran impuls gràcies al desenvolupament de les tècniques *in vitro* per als estudis moleculars, afavorint l'avenç de la biotecnologia, l'enginyeria genètica i la teràpia gènica.

En les últimes dècades, la branca de la investigació genètica ha progressat molt ràpid, i d'ençà la creació dels primers mamífers transgènics, es va dur a terme la clonació del primer mamífer a partir d'una cèl·lula adulta al 1996: l'ovella Dolly¹²⁷.

1.5.1.2 *Legislació.*

La investigació amb animals és essencial per al progrés dels coneixements mèdics. Tanmateix, a diferència dels primers estudis realitzats fa dècades i, a causa d'una creixent inquietud de la comunitat científica, actualment existeix una reglamentació i uns principis ètics que vetllen pel correcte compliment dels estàndards de qualitat i de benestar animal.

En termes ètics, la investigació ha d'aportar un benefici per a l'home o per als animals, i a més a més s'han de contemplar un seguit de requisits per tal de garantir l'ús racional dels animals i una metodologia de treball adequada¹²⁸.

Al 1954, l'Universities Federation for Animal Welfare (UFAW) va designar Russell i Burch per iniciar estudis sistemàtics de tècniques experimentals des d'una perspectiva ètica. Fruit d'aquestes recerques van publicar "*The Principles of Humane Experimental Techniques*", on es recull el mundialment conegut "Principi de les 3R's: Refinar, Reduir i Reemplaçar"¹²⁹ per a una correcta pràctica experimental. Les 3R's es refereixen a intentar, sempre que sigui possible "Reemplaçar" els animals d'experimentació per altres mètodes, intentar "Reduir" el nombre d'animals utilitzats i perfeccionar o "Refinar" les tècniques per a disminuir el dolor, el patiment o el malestar dels animals^{129,130}.

Aquests conceptes han evolucionat amb els anys i actualment, a part d'evitar el patiment animal, es propicia la millora de la seva qualitat de vida. Amb aquest objectiu, noves línies de recerca i enfocament s'estan duent a terme per a aconseguir realitzar una experimentació animal més ètica i alhora més eficient¹³¹⁻

134.

Introducció

Així mateix, la creació dels comitès d'ètica d'experimentació animal (CEEAA), amb la seva corresponent legislació específica, aporta una necessària regulació dels procediments que involucren models animals.

En l'àmbit legislatiu, la Unió Europea va presentar la nova directriu 2010/63/UE, derogant la prèvia de l'any 1986, relativa a la protecció dels animals utilitzats per a finalitats científiques¹³⁵. A Espanya, aquesta directriu es va adaptar a la normativa nacional, mitjançant el Real Decreto 53/2013¹³⁶. Tanmateix, cada comunitat autònoma té la potestat de legislar de forma més o menys estricta; a Catalunya, el Decret 214/1997 és l'encarregat de regular la utilització d'animals per a l'experimentació i altres finalitats científiques¹³⁷.

1.5.2 Estudis de lesió nerviosa en experimentació animal.

1.5.2.1 Generalitats.

Els estudis de lesió nerviosa en models *in vivo* són, encara avui en dia, el pilar fonamental dels avenços en el coneixement dels mecanismes de lesió nerviosa.

Citant a Josep Santaló¹:

“Hasta que los ordenadores no sean capaces de mimetizar la complejidad de un organismo, será complicado poder reemplazar por completo el uso de los animales”.

En els últims anys, s'està iniciant una línia experimental amb models *in vitro*, que encara no han aconseguit emular les opcions que permeten els models *in vivo* atès que són insuficients per reproduir la regeneració nerviosa¹³⁸.

Malgrat això, és important esmentar que tot i que actualment s'estiguin utilitzant models animals per mimetitzar els complexos mecanismes de lesió nerviosa, hi ha diferències importants que poden dur a extrapolarions confuses. Per posar un exemple, en el cas del plexe braquial, que compta amb un alt grau de desenvolupament i una complexitat destacable a nivell funcional, el model experimental ideal seria el primat però s'han estat utilitzant altres models com la

¹ Catedràtic de biologia cel·lular i president de la Comissió ètica en l'experimentació animal i humana de la Universitat Autònoma de Barcelona (UAB).

rata, el conillet d'índies, el gos, el gat o el porc. És important destacar que aquests models presenten diferències anatòmiques de rellevància com la posició anatòmica quadrúpeda, l'absència de cintura escapular, la fusió de la coracoides amb l'escàpula o bé la distància entre el nervi i els òrgans diana que és més curta en aquests models. Aquest últim punt tindria especial rellevància perquè podria reduir el temps de recuperació neuronal en comparació amb l'humà³⁶.

Tradicionalment, el model animal més utilitzat per a l'estudi de les lesions nervioses ha estat el rosegador, específicament la rata, a causa de que va ser de les primeres espècies a estudiar-se des del punt de vista anatòmic i en trobar similituds amb els nervis humans. Tot i això, ja fa temps que es va començar a destacar el paper discriminatiu de la mida i de la quantitat de teixit connectiu del nervi i, sobretot, l'elevada capacitat neuroregenerativa dels rosegadors, tots dos molt diferents de l'humà^{2,139}.

El model experimental de lesió nerviosa més utilitzat al llarg dels anys ha estat el de l'aixafament (axonotmesi), pel fet que aquest suposa la causa més freqüent de lesió nerviosa, és més fàcil de realitzar des d'un punt de vista quirúrgic i suscita menys qüestions ètiques per al benestar animal⁴⁶.

L'ús de models animals petits ha representat sempre la primera opció per la seva major disponibilitat, capacitat d'estabulació i de manipulació i cost econòmic. No obstant això, a causa de la necessitat de trobar models més semblants pel que fa a capacitat neuroregenerativa, l'ús d'animals grans és indiscutiblement necessari¹⁴⁰. Dins d'aquest grup, el model oví ha anat guanyant reconeixement a causa de la mida dels nervis i la taxa de regeneració neuronal, molt similars als de l'humà. Tanmateix, és curiós destacar que tot i que en la majoria d'estudis experimentals s'usa el nervi ciàtic¹⁴¹, actualment es disposa d'escassa literatura en nervi ciàtic d'ovelles i el model de lesió utilitzat en ovins és la neurotmesi i no l'axonotmesi¹⁴².

El nervi ciàtic va ser ja l'utilitzat en els inicis de l'experimentació animal pel fet que és el nervi perifèric més gran i de major recorregut i perquè es disposa de nombroses proves funcionals i tests de comportament per a aquest nervi^{2,143}. Recentment s'està començant a investigar amb altres nervis, tant de les extremitats posteriors com anteriors en models animals. El motiu de tenir interès en les extremitats anteriors es deu a que no limiten tant la locomoció en estudis de

Introducció

llarga durada i en què, per exemple, el nervi medià presenta un únic fascicle al llarg de tot el seu recorregut i això permet una millor anàlisi morfològica⁴⁶.

1.5.2.2 *Estudis pioners en lesió nerviosa associada a anestèsia regional.*

En el camp de l'anestèsia regional i l'estudi de les lesions iatrogèniques, els models més àmpliament utilitzats han estat les rates, conills, porcs i gossos^{9,10,104,144}.

Fa ja més de quatre dècades, Selander¹⁰ va realitzar els primers estudis experimentals en nervi ciàtic de conill (Figura 15):

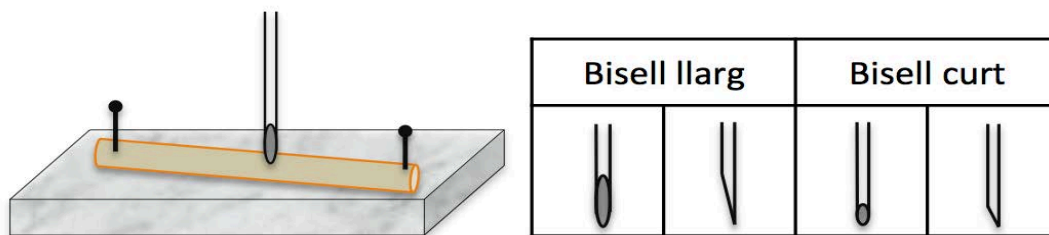


Figura 15. Estudis de lesió nerviosa en nervi ciàtic de conill.

Va estudiar l'efecte del tipus de bisell de l'agulla en la lesió nerviosa i va determinar que el risc de lesió era més gran amb bisells llargs i, per aquest motiu, va aconsellar utilitzar bisells curts per a la pràctica de les punccions anestèsiques. No obstant això, només uns anys més tard, Rice va reproduir el mateix estudi en model animal de rata i va publicar uns resultats totalment contradictoris. Davant aquests resultats a priori tan dispars cal tenir en compte que el model experimental utilitzat va ser diferent i que també la mida de les agulles no va ser la mateixa. Així i tot, aquests estudis tan heterogenis van servir de base per dissenyar i comercialitzar les agulles de neuroestimulació modernes.

En els últims anys estan apareixent nous models de lesió iatrogènica associada al bloqueig nerviós, destacant l'estudi del plexe braquial o el nervi femoral en model experimental gran^{103,145}.

Considerant la diferència de mides entre els nervis ciàtics procedents de diferents espècies animals, cal destacar el tipus i mida d'agulla utilitzada per avaluar les lesions estudiades per diferents autors. En la següent taula es mostra un resum

dels estudis de lesió nerviosa depenent de la configuració de l'agulla d'anestèsia regional utilitzada (Taula 2):

Autor (Any)	Espècie Nervi	Estudi	Mètode	Configuració agulla	Conclusió
Selander (1977)	Conill Ciàtic	Comparació bisell d'agulla	Punció única <i>de visu</i>	0,4-0,7mm Bisell llarg (14°) vs curt (45°)	Bisell llarg és més lesiu
Rice (1992)	Rata Ciàtic	Comparació bisell d'agulla	Punció única <i>de visu</i>	0,63-0,71mm Bisell llarg (12°) vs curt(27°)	Bisell curt és més lesiu
Steinfeldt (2010)	Porc Plexe braquial	Comparació diàmetre d'agulla	Punció única <i>de visu</i>	0,56-0,91mm	Agulles de diàmetres majors causen més dany nerviós
Steinfeldt (2010)	Porc Plexe braquial	Comparació bisell d'agulla	Punció única <i>de visu</i>	0,56mm Bisell "punta de llapis" vs 30°	No hi ha diferències en quant a incidència de lesió nerviosa
Steinfeldt (2010)	Porc Plexe braquial	Comparació bisell d'agulla	Punció única <i>de visu</i>	0,91-1,02mm	No hi ha diferències en quant a incidència de lesió nerviosa

Taula 2. Resum dels estudis experimentals en models animals depenent de la configuració de l'agulla de punció.

1.5.2.3 Estudis sobre la validesa de la monitorització de la pressió d'injecció per evitar puncions intraneurals.

Ja fa dècades que es va reportar el primer estudi de paràlisi del nervi ciàtic després d'una injecció de quinina i, a partir de llavors, s'han succeït multitud d'estudis en aquesta mateixa línia amb diversos agents implicats¹⁴⁶. Els primers estudis realitzats en rata injectant antibiòtics dins el nervi ciàtic ja van demostrar degeneració axonal i mielínica i fibrosi del teixit connectiu nerviós¹⁴⁷.

És un fet àmpliament conegut que el lloc d'injecció és un factor determinant per l'aparició d'una lesió nerviosa¹⁴⁶ i els mètodes tradicionalment utilitzats per assegurar una injecció nerviosa extraneural tals com la neuroestimulació, s'han començat a qüestionar recentment¹⁴⁸.

Introducció

S'ha evidenciat que fins i tot amb la punta de l'agulla en posició intraneural i sota els paràmetres clínics de neuroestimulació, habitualment usats, de vegades no és possible aconseguir una resposta motora per diversos motius encara no ben explicats: hiperpolarització prèvia del nervi que l'incapaciti per respondre encara que estigui en contacte amb l'agulla, fluxos de corrent no lineals des de l'elèctrode de l'agulla al nervi per interferència dels teixits circumdants o bé per la disposició de les fibres motores i sensibles dins del nervi^{149,150}. Per aquest motiu, la monitorització de la pressió d'injecció es presenta com un dels factors claus per evitar la lesió nerviosa degut a que detecta en un altíssim percentatge els contactes nervi-agulla i així es pot prevenir la injecció intraneural¹⁵¹. Així mateix, aquesta monitorització permet discernir entre una posició de punta d'agulla intraneural però extrafascicular d'una injecció intraneural pròpiament intrafascicular, que seria la responsable de la lesió nerviosa¹⁵².

En els últims 15 anys multitud d'estudis s'han focalitzat en el possible dany neuronal d'injectar substàncies a alta pressió. Cal destacar els estudis inicials en el nervi ciàtic de gos que van propiciar que la casa comercial Braun dissenyés el dispositiu per monitoritzar la pressió d'injecció en bloquejos nerviosos^{144,153}. En la següent taula es pot observar un resum dels principals estudis en model experimental animal sobre les injeccions intra o extraneurals (Taula 3):

Autor (Any)	Espècie Nervi	Estudi	Mètode	Configuració agulles	Conclusió
Hadzic (2004)	Gos Ciàtic	Injeccions intraneurals	Ecografia + monitorització pressió injecció	0,45mm	Posició intraneural + alta pressió d'injecció causa lesió nerviosa
Iohom (2005)	Rata Ciàtic	Injeccions intraneurals	Anàlisi de la marxa	0,25mm	Ropivacaïna intraneural a concentracions de pràctica clínica habitual no ocasiona lesió motora
Vuckovic (2006)	Rata Medià	Injeccions intraneurals	Monitorització pressió injecció	0,36mm	Altes pressions indiquen posició intraneural
Chan (2007)	Porc Plexe braquial	Injeccions intraneurals	Ecografia + neuroestimulació	0,64mm	- Ecografia diagnòstica injeccions intraneurals - Estímuls baixos no sempre indiquen posició intraneural
Kapur (2007)	Gos Ciàtic	Injeccions intraneurals	Monitorització pressió injecció	0,45mm Bisell curt (30°)	- Lesions intraneurals no sempre són lesives - Pressions d'injecció altes suggereixen posició intrafascicular
Tsui (2008)	Porc Ciàtic	Injeccions intraneurals	Impedància elèctrica	0,56mm	Impedància elèctrica permet discernir entre intra i extraneural
Lupu (2010)	Porc Medià	Injeccions intraneurals	Ecografia + avaluació funcional	0,64mm	La injecció intraneural ocasiona dany histològic però no necessàriament funcional
Hasanbegovic (2013)	Rata Ciàtic	Injeccions intraneurals	Punció única <i>de visu</i>	0,36mm	Lesió intrafascicular és la responsable del dany
Kirchmair (2016)	Porc Ciàtic	Efecte traumàtic agulla	Ecografia + Monitorització potencials acció	0,8mm Bisell curt (45°)	- Trauma causat per agulla ocasiona alteració potencials acció - Si s'afegeix una injecció intraneural, empitjora la lesió nerviosa
Vassiliou (2016)	Porc Plexe braquial	Incidència contacte nervi-agulla	Neuroestimulació	0,64mm	Intensitats elèctriques altes redueixen incidència de contacte nervi-agulla

Taula 3. Resum dels estudis d'experimentació en models animals dependent de la localització de l'agulla i lloc d'injecció.

Introducció

Actualment la triple monitorització recomanada en la pràctica clínica seria: resposta motora dins d'uns paràmetres definits de neuroestimulació, avaluació ecogràfica dinàmica del nervi i de la punta de l'agulla (aconseguir imatge de "donut" de la solució injectada i evitar l'aparició del *swelling* o engruiximent del nervi) i, per últim, la monitorització simultània de la pressió d'injecció per sota d'uns valors prèviament definits.

Donada la importància del tema de la lesió nerviosa associada a l'anestèsia regional, es requereix augmentar els estudis de medicina translacional per poder realitzar una correcta valoració i prevenció de les mateixes.

JUSTIFICACIÓ

*“Aquéllos que no recuerdan el pasado
están condenados a repetirlo”*

Santayana.

2. JUSTIFICACIÓ.

L'increment en l'ús de l'anestèsia regional ha augmentat l'interès en el camp de l'estudi de l'anatomia, la microanatomia i de les possibles injeccions intraneurals no intencionades que poden donar origen a lesions nervioses. Així mateix, la necessitat de perfeccionament de les tècniques de reparació nerviosa per a una millor recuperació funcional també exigeix un major coneixement en aquest tipus de patologia. Per aquest motiu, es requereix identificar la validesa de diferents models animals per a aquests estudis comparant la seva morfologia, i impulsar el reconeixement dels diferents esdeveniments que puguin ocórrer en una injecció intraneural accidental que permetin una directa extrapolació a l'humà i l'avenç en aquest camp.

Al llarg de la història, s'han utilitzat diversos models animals per a l'estudi de les possibles injeccions intraneurals i, eventualment, de les lesions nervioses iatrogèniques durant la realització de bloquejos nerviosos. No obstant això, en comparar aquests estudis s'evidencia que són heterogenis pel que fa a metodologia^{9,10} i, sobretot, pel que fa a l'espècie animal seleccionada, destacant que els resultats són sovint contradictoris. El fet que aquests estudis hagin estat utilitzats en la medicina translacional i, per tant, han generat les conclusions en l'ésser humà, comporta que sorgeixin alguns dubtes o qüestions sobre la seva validesa.

De la mateixa manera, s'han descrit diferents marcadors i mètodes de tinció per poder realitzar els estudis de les injeccions intraneurals i lesions nervioses, però no hi ha hagut una anàlisi crítica de la metodologia usada durant tot el procés de preparació de les mostres en relació a possibles alteracions i artefactes que puguin ocórrer, donant origen a unes conclusions inconsistentes.

HIPÒTESIS I OBJECTIUS

*“Es en los momentos de mayor oscuridad
cuando nos enfocamos para ver la luz”*

Aristóteles Onassis.

3. HIPÒTESIS I OBJECTIUS.

3.1 Hipòtesis.

Actualment l'ús de models animals és fonamental per a l'estudi de les injeccions intraneurals i les possibles lesions nervioses, però es desconeix el criteri usat fins ara per triar un o altre model en els diferents estudis publicats. A la nostra hipòtesi destaquem que la possible variabilitat morfològica del nervi ciàtic entre diferents espècies animals i l'humà, evidencia l'escàs valor que té l'extrapolació de resultats i conclusions obtingudes a partir de models animals que no hagin estat validats prèviament amb l'humà.

L'ús de nous marcadors com ara els eritròcits heparinitzats poden aportar noves dades sobre la gènesi de possibles complicacions relacionades amb la injecció intraneural de solucions anestèsiques, respecte a resultats obtinguts amb l'ús previ de la tinta xinesa.

3.2 Objectius principals.

- 1) Comparar l'estructura microanatòmica del nervi ciàtic en diferents espècies animals i en l'humà, per avaluar i validar quin és més compatible amb el ser humà.
- 2) Validar l'ús de sang heparinitzada com a marcador d'estudis d'injeccions nervioses.

3.3 Objectius secundaris.

- 1) Confrontar les diferents espècies animals utilitzades clàssicament en medicina translacional per a l'estudi de la lesió nerviosa.
- 2) Determinar les característiques morfològiques ecogràfiques del nervi ciàtic en diferents espècies animals i en l'humà.
- 3) Determinar el comportament de la sang heparinitzada i la seva distribució dins dels components que formen el teixit del nervi perifèric.

MATERIAL I MÈTODES

*“El éxito consiste en ir de fracaso en fracaso
sin perder el entusiasmo”*

Winston Churchill.

4. MATERIAL I MÈTODES.

Aquesta Tesi planteja, en format de compilació d'articles, revisar la validesa dels models animals utilitzats fins l'actualitat per a l'estudi de les injeccions intraneurals (Estudi 1), aportar una alternativa al marcador estàndard actual, la tinta xinesa, que ens permeti estudiar millor els fenòmens relacionats amb la difusió i extensió de la substància injectada (*spreading*) (Estudi 2) i, per últim, de manera extra, l'aplicació en model animal i humà del nou marcador per estudiar els possibles fenòmens dins del nervi que ocorren durant una injecció intraneural (Estudi 3).

4.1 Estudi 1.

En aquest primer estudi es va pretendre revisar quines de les espècies animals utilitzades de forma habitual en experimentació preclínica eren més compatibles amb l'humà. Per tal de poder-ho portar a terme, es va plantejar un estudi comparatiu de la microanatomia del nervi ciàtic de diferents espècies animals, inclòs l'humà, fent un estudi histològic i ecogràfic de mostres.

Previ a l'inici de l'estudi es van obtenir les aprovacions del CEEA de l'Institut de Recerca Vall d'Hebron (protocol 66/15) i del Comitè Ètic d'Investigació Clínica (CEIC) de Grupo Hospitales Madrid (codi 147-GHM).

Es van analitzar mostres procedents de nervi ciàtic de diferents espècies agrupats en 6 categories: 4 mostres de rata Wistar, 4 mostres de conill New Zealand, 4 mostres de porc híbrid, 4 mostres d'ovella Ripollesa, 2 mostres de Beagle i 4 mostres de cadàver humà.

Els animals es van manipular d'acord als "Principis ètics de les 3R's" acceptats internacionalment (reemplaçament, reducció i refinament). En tots els casos es van utilitzar animals provinents d'altres estudis que no presentessin interferència amb el nostre estudi. Abans de la manipulació quirúrgica, els subjectes no humans van ser eutanasiats per una sobredosi de pentobarbital sòdic i es va confirmar la mort per parada cardíaca. Les disseccions del nervi ciàtic es van realitzar de forma bilateral en 4 subjectes de cada espècie (excepte només en 2 gossos per disponibilitat limitada).

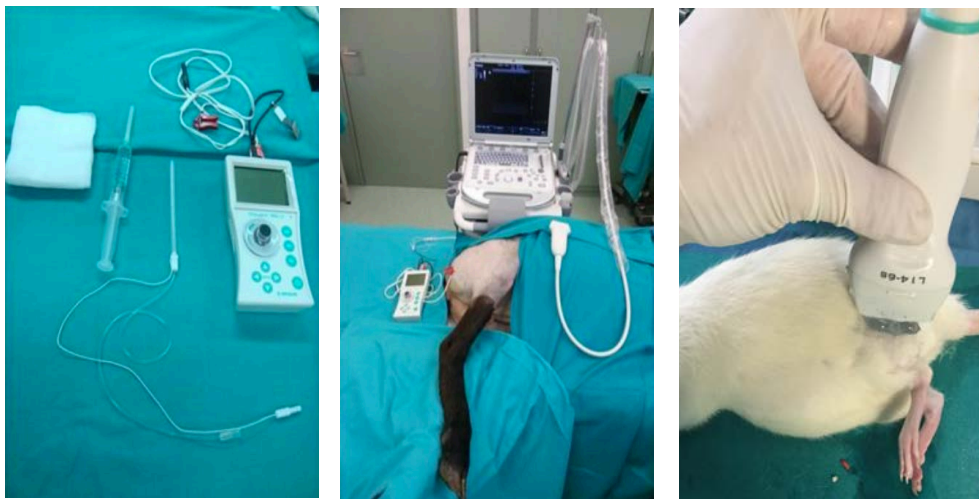
L'estudi es va iniciar col·locant els animals en decúbit lateral, sota sedació, amb l'extremitat a examinar en la part superior.

- Estudi anatòmic guiat per ecografia

Es va procedir a realitzar un estudi ecogràfic del nervi ciàtic de les espècies animals per poder realitzar una correlació entre la mida histològica i ecogràfica, i també per poder identificar el nervi al llarg del seu recorregut.

L'estudi ecogràfic es va portar a terme amb els següents dispositius i materials:

- ✓ Equip portàtil d'ultrasons Mindray M7 (Schenzhen Mindray BioMedical Electronics Co., LTD. Nanshan, Shenzhen, Xina)
- ✓ Transductor Convex C5-2s, 2,5-5 MHz (Schenzhen Mindray BioMedical Electronics Co., LTD. Nanshan, Shenzhen, Xina)
- ✓ Transductor Lineal L14-6Ns, 8-12 MHz (Schenzhen Mindray BioMedical Electronics Co., LTD. Nanshan, Shenzhen, Xina)
- ✓ Agulla d'estimulació nerviosa ecogènica, 22G x 50 mm, (Echoplex®, Vygon, Ecouen, França)
- ✓ Neuroestimulador, Stimuplex® HNS 12 (B. Braun, Melsungen, Alemanya)
- ✓ Transonic Gel 250ml (TELIC, S.A., Barcelona, Espanya)



Fotografia 14. Preparació i material per a l'estudi ecogràfic: neuroestimulador i ecògraf.

Es va realitzar un examen dinàmic al llarg de l'extremitat començant a la zona de la tuberositat isquiàtica i el trocànter major del fèmur amb un transductor de baixa freqüència o cònvex en les espècies grans (porc i ovella) i d'alta freqüència o lineal en les petites (rata, conill i gos). Un cop identificada la imatge hiperecogènica compatible amb el nervi ciàtic, per corroborar que la identificació era correcta, es va utilitzar la neuroestimulació. L'aparell de neuroestimulació es va aplicar mitjançant un elèctrode de pinça de cocodril a la pell/pelatge o lòbul de l'orella de l'animal i es va connectar a una agulla de neuroestimulació. Es va purgar el sistema

Material i Mètodes

amb sèrum glucosat al 5% i es va anar avançant l'agulla cap a l'objectiu sota control ecogràfic estricte; quan es va considerar per imatge ecogràfica que la punta de l'agulla estava propera al nervi, es va connectar el neuroestimulador a una intensitat de 0,3-0,5mA i es va resituar l'agulla segons necessitat fins aconseguir un estímul de flexo-extensió de l'extremitat posterior de l'animal, pertanyent a la resposta motora del nervi ciàtic.

Un cop identificat el nervi, es va buscar ecogràficament la zona de bifurcació del nervi en les dues branques distals (nervi tibial i nervi peroneo comú) i es va adquirir una imatge ecogràfica.

- Dissecció anatòmica i escissió del nervi ciàtic.

Es va procedir a eutanasiar els animals tal i com s'ha descrit prèviament i tant en els animals com en els cadàvers humans es va realitzar una dissecció de l'extremitat fins arribar al pla muscular on s'observava el nervi en tot el seu recorregut. Els nervis es van disseccionar del compartiment posterior de l'extremitat posterior/cama en la divisió en les 2 branques terminals.



Fotografia 15. Material quirúrgic utilitzat per a realitzar la dissecció anatòmica.

- Preparació de les mostres i microscòpia òptica.

Després de l'escissió, les mostres es van fixar en formaldehid tamponat al 10% durant 15 dies i seguidament es van processar amb cera de parafina i es van realitzar 10 seccions successives a intervals de 20 μm (3 μm de gruix) utilitzant un micròtom. Es va procedir a tenyir-les amb hematoxilina-eosina en condicions

estàndard i es van examinar amb un microscopi òptic amb augment inicial de 800X (microscopi Leica DM5500 B; Leica SCN Microsystems Wetzlar GmbH, Wetzlar, Alemanya). Les imatges es van capturar amb una càmera (Leica DFC425; Leica SCN Microsystems Wetzlar GmbH), i les imatges de les seccions transversals completes es van guardar amb un escàner (Leica SCN400 Slide Scanner; Meyer Instruments, Inc, Houston, Texas). Es va obtenir una imatge de cada mostra de nervi per a l'anàlisi.

- Anàlisi d'imatges histològiques.

Es va utilitzar un programa de processament d'imatges (ImageJ; National Institutes of Health, Bethesda, Maryland) per quantificar diferents paràmetres: número, àrea, circumferència i radi dels grups de fascicles i dels propis fascicles individuals. Les àrees de la secció transversal del nervi i del fascicle es van expressar amb mil·límetres al quadrat i les circumferències i radis en mil·límetres. Tenint en compte que els fascicles són figures geomètriques irregulars que s'assemblen més a una el·lipse, les àrees de superfície es van calcular a partir de la següent fórmula:

$$\text{Àrea} = \pi ab$$

on "a" és el radi de l'eix més llarg de l'elipse i "b" el de l'eix més curt.

Per indicar la fracció de teixit no neural (en la seva majoria teixit adipós), es va calcular la relació de l'àrea de la secció transversal del fascicle (FA) amb l'àrea de la secció transversal del nervi total (TNA), dividint la suma de les FA per cada espècimen entre la suma de les TNA.

Les imatges es van processar amb magnituds iguals i tots els càlculs van ser realitzats per la doctoranda per minimitzar el biaix de rendiment.

- Mètodes estadístics

Les dades s'expressen com medianes (rang interquartílic). La relació FA:TNA representava la quantitat de cèl·lules adiposes i, en menor mesura, el teixit connectiu en els nervis ciàtics de cada espècie.

Les comparacions de grup es van realitzar utilitzant la prova de Kruskal-Wallis. Degut a la limitació per les mides mostrals petites, les comparacions *post hoc* entre parells es van avaluar amb la prova U de Mann-Whitney. El llindar de significació

Material i Mètodes

corregit de Bonferroni (per 15 proves de parells) es va establir en $p < 0,0033$. Les diferències de la mediana per parells es van calcular utilitzant l'estimador de Hodges-Lehmann amb intervals de confiança del 99,7%. Totes les anàlisis es van realitzar en JMP Pro 13 (SAS Institute, Inc, Cary, Carolina del Norte).

4.2 Estudi 2.

En la segona fase de la Tesi, es pretenia validar l'ús d'un nou biomarcador per l'estudi de les lesions nervioses en mostres de cadàver humà, com alternativa a la tinta xinesa.

L'estudi es va realitzar amb l'aprovació del CEIC de Grupo Hospitales Madrid amb número de registre 16.03.0922 (obtenció de sang de pacients) i 09.05.047 (injecció en cadàvers humans).

- Obtenció de les mostres de sang

Es van recollir mostres de sang provinents de quiròfan de pacients que voluntàriament van donar el seu consentiment informat. Els pacients estaven lliures de malalties infeccioses o hematològiques, tenien un hematòcrit entre el 32-40% i estaven programats per a tractament electiu de la fibril·lació auricular.

La recollida de mostres es va realitzar durant l'ablació de la via elèctrica auricular quan es va aconseguir una anticoagulació apropiada pel procediment mitjançant l'administració contínua d'heparina endovenosa. El volum utilitzat en la investigació resultava del volum sobrant de sang extreta en successives preses pel control del nivell d'anticoagulació durant els procediments que tenien una duració mitja de 5-6 hores. Es va obtenir un total de 50 ml de sang de cada pacient, resultat d'aquestes múltiples extraccions i es va emmagatzemar durant 1-2 dies a 5°C després d'addicionar 25.000 UI d'heparina, augmentant així el volum de la mostra a 75 ml. Per poder finalitzar el marcador, es va afegir sèrum fisiològic al 0,9% fins aconseguir un hematòcrit del 15%. Les mostres de sang de diferents pacients no van ser mai mesclades.

A la barreja resultant de la sang, heparina i solució salina la vam anomenar "HBS" i les solucions recol·lectades dels pacients es van utilitzar per als 32 bloquejos nerviosos simulats. Es van utilitzar aproximadament uns 5-10ml per cada bloqueig, pel que cada mostra es va reutilitzar per a diferents bloquejos i es va rebutjar el sobrant.

- Injeccions nervioses en mostres humanes

En el Departament d'Anatomia es van simular 4 tipus diferents de bloquejos nerviosos (plexe infraclavicular, axil·lar, medià a nivell del colze i nervi ciàtic) en 4 cadàvers; per tant, es van realitzar un total de 32 bloquejos.

El material utilitzat va ser:

- ✓ Equip portàtil d'ultrasons Mindray M7 (Schenzhen Mindray BioMedical Electronics Co., LTD. Nanshan, Shenzhen, Xina)
- ✓ Transductor Cònvex C5-2s, 2,5-5 MHz (Schenzhen Mindray BioMedical Electronics Co., LTD. Nanshan, Shenzhen, Xina)
- ✓ Transductor Lineal L14-6Ns, 8-12 MHz (Schenzhen Mindray BioMedical Electronics Co., LTD. Nanshan, Shenzhen, Xina)
- ✓ Agulla d'estimulació nerviosa Stimuplex D, 22G i 15° de bisell (B.Braun, Melsungen, Hesens, Alemanya).
- ✓ Neuroestimulador, Stimuplex® HNS 12 (B. Braun, Melsungen, Alemanya)
- ✓ Transonic Gel 250ml (TELIC, S.A., Barcelona, Espanya)
- ✓ Material bàsic de dissecció.

Els quatre cadàvers es van obtenir del Programa de Donació de Cossos del Departament d'Anatomia Humana de l'Escola de Medicina de la Universitat CEU San Pablo. Es van mantenir refrigerats a una temperatura de 4° C fins descartar qualsevol malaltia infecciosa i en el marge de 36 hores es va procedir a congelar-los a -20° C y mantenir-los entre 5-7 dies. Seguidament es va procedir a descongelar-los en dues fases, inicialment deixant-los a 4° C durant 48 hores i després per sota de 22° C durant 6-8 hores. En cap moment del procés no es van utilitzar cap tipus d'agents conservants o fixadors.

El procediment es va realitzar de forma ecoguiada, com en la pràctica clínica habitual dels bloquejos nerviosos. Es va localitzar el nervi diana i posteriorment es va procedir a injectar el HBS de manera fraccionada. Es va comprovar la posició idònia de l'agulla mitjançant el signe del "donut", anomenat així per la hidrodissecció que provoca la substància administrada. Aquesta imatge s'associa a una injecció per fora del nervi, envoltant-lo, i és el resultat de separar adipòcits dins dels compartiments grassos que es limiten entre l'epimisi i el circumneuri (anteriorment mencionat paraneuri), que envolta els nervis. Aquest és considerat

l'espai òptim per realitzar el dipòsit de l'anestèsic local en els casos de bloquejos per injecció única.

La injecció intraneural es va evitar en la mesura del que permetien les limitacions de resolució dels equips d'ultrasons estàndards utilitzats en la pràctica mèdica habitual.

Paral·lelament també es van realitzar injeccions nervioses amb tinta xinesa seguint la mateixa metodologia emprada pel HBS per reproduir condicions d'investigació realitzades prèviament per molts altres grups investigadors. Això va permetre fer una comparació més fidedigna entre ambdós marcadors per poder posar de manifest els avantatges i desavantatges i destacar aspectes de nova visualització amb el nou marcador.

- Processament de les mostres i anàlisi de les imatges histològiques.

Seguidament es va procedir a disseccionar els blocs injectats de cadàver humà amb àrees que continguessin els nervis, teixits circumdants i vasos sanguinis i es va realitzar una fixació amb formaldehid al 10% durant 7 dies.

Els blocs es van tallar perpendicularment a l'eix llarg dels nervis en talls de teixit de 5 a 6 mm de gruix i es van tornar a submergir en formaldehid tamponat al 10% durant 10 dies més.

Les seccions histològiques es van preparar per al seu estudi per microscòpia òptica processant-les amb cera de parafina i seccionant-les en rodanxes de 3 µm amb un micròtom. Seguidament es va procedir a fer la tinció amb hematoxilina i eosina en condicions estàndard i es van examinar amb un microscopi d'escombratge o rastreig (Leica SCN400 Slide Scanner, Meyer Instruments, Inc., Houston, TX, EE. UU.).

El moviment transmembrana d'HBS als diversos compartiments de teixit i la formació de possibles coàguls per agregació d'eritròcits van ser analitzats revisant la possibilitat d'extravasació dels compartiments.

4.3 Estudi 3.

En l'última fase de la Tesi, amb l'objectiu d'aprofundir en el coneixement dels fenòmens ocorreguts durant una injecció intraneural, vam investigar l'efectivitat del nou marcador (sang heparinitzada) injectat de forma deliberada a nivell intraneural en cadàver humà i animal.

L'estudi en mostres humanes procedents de cadàver fresc i l'ús de mostres de sang procedent de pacients es va realitzar amb l'aprovació del CEIC de Grupo Hospitales Madrid 16.03.0922 (obtenció de sang de pacients) i 09.05.047 (injecció en cadàvers humans).

L'estudi amb les mostres animals es va realitzar sota aprovació del CEEA del VHIR amb número de registre 11/18 i les mostres de sang humana amb l'aprovació del CEIC de l'Hospital Universitari Vall d'Hebron 53/2018.

- Obtenció de les mostres de sang de l'estudi amb cadàver animal

Amb l'autorització prèvia mitjançant consentiment informat per part dels voluntaris, es van recollir mostres de sang provinents dels aspiradors del camp quirúrgic de cirurgies de columna programades a l'Hospital de Traumatologia de la Vall d'Hebron. Igual que en l'estudi previ, els pacients no presentaven cap malaltia infecciosa o hematològica i l'hematòcrit variava entre el 32-40%.

Es van obtenir 25 ml de sang de cada pacient de la sang acumulada en l'aspirador, es van afegir 25.000 UI d'heparina i també es va diluir amb sèrum fisiològic al 0,9% fins a aconseguir un hematòcrit del 15%, per aconseguir el mateix tipus d'HBS que en l'estudi anterior.

- Injeccions intraneurals en cadàver animal

Seguidament es va procedir a realitzar injeccions intraneurals deliberades *de visu* en models animals a les instal·lacions del VHIR. Es van reaprofitar individus recentment eutanasiats d'experiments previs que, prèvia valoració científica, no tinguessin cap tipus d'afectació en l'aparell múscul-nerviós per evitar interferències en el nostre estudi. Es van utilitzar 2 mostres de cadascuna de les següents espècies: rata Wistar, conill New Zealand, porc híbrid, ovella Ripollesa i gos Beagle.

El material utilitzat va ser:

- ✓ Material bàsic de dissecció.
- ✓ Agulla d'estimulació nerviosa ecogènica, 22G x 50 mm, (Echoplex®, Vygon,

Ecouen, França).

Després d'una acurada dissecció amb exposició del nervi ciàtic i la divisió en les seves dues branques, les injeccions es van fer totes sota visió directa a l'àrea de bifurcació, sense ús d'ecografia, per assegurar la injecció intraneural. El volum a injectar va dependre de l'espècie triada. Posteriorment es va incloure en l'estudi de forma extra, dues injeccions intraneurals de tinta xinesa en el model animal de porc i ovella, per poder comparar l'efectivitat de tots dos marcadors en les troballes.

- Obtenció de les mostres de sang de l'estudi amb cadàver humà

Les mostres es van obtenir de la mateixa manera que en l'estudi 2.

- Injeccions intraneurals en cadàver humà

En el Departament d'Anatomia es van simular bloquejos nerviosos de 8 nervis ciàtics, en la regió poplítia, en quatre cadàvers frescos utilitzant HBS en lloc d'anestèsic local o els marcadors tradicionals. Es van intentar realitzar de forma intencionada injeccions intraneurals, confirmades segons els signes ecogràfics que en la pràctica clínica s'usen per evitar la injecció intraneural, tal com l'efecte *swelling*. En un cinquè cadàver es van realitzar dues injeccions intraneurals del nervi ciàtic a la regió poplítia usant tinta xinesa per avaluar possibles diferències respecte a l'ús d'eritròcits heparinitzats.

Material i Mètodes

El material utilitzat va ser:

- ✓ Equip portàtil d'ultrasons Mindray M7 (Schenzhen Mindray BioMedical Electronics Co., LTD. Nanshan, Shenzhen, Xina)
- ✓ Transductor Cònvex C5-2s, 2,5-5 MHz (Schenzhen Mindray BioMedical Electronics Co., LTD. Nanshan, Shenzhen, Xina)
- ✓ Transductor Lineal L14-6Ns, 8-12 MHz (Schenzhen Mindray BioMedical Electronics Co., LTD. Nanshan, Shenzhen, Xina)
- ✓ Agulla d'estimulació nerviosa Stimuplex D, 22G i 15° de bisel (B.Braun, Melsungen, Heslen, Alemanya).
- ✓ Neuroestimulador, Stimuplex® HNS 12 (B. Braun, Melsungen, Alemanya)
- ✓ Transonic Gel 250ml (TELIC, S.A., Barcelona, Espanya)
- ✓ Material bàsic de dissecció.

El procediment es va realitzar de forma ecoguiada, com en la pràctica clínica habitual dels bloquejos nerviosos. En alguns casos també es va evidenciar el signe del "donut", per la sortida de la solució injectada per fora del nervi, donat l'alt volum usat a propòsit per recrear les pitjors condicions d'una injecció intraneural.

Els cinc cadàvers es van tornar a obtenir del Programa de Donació de Cossos del Departament d'Anatomia Humana de l'Escola de Medicina de la Universitat CEU San Pablo i es van tractar i conservar de la mateixa manera que en l'estudi 2. La diferència metodològica entre les injeccions intraneurals realitzades en cadàvers humans o animals, va ser que mentre en els cadàvers humans, les injeccions van ser percutànies tal com es fa en els pacients, en els animals el procediment va ser diferent, amb visió directa, per assegurar la injecció.

- Processament de les mostres i anàlisis de les imatges histològiques.

El processament de les mostres i anàlisis va ser el mateix que en l'estudi previ.

RESULTATS

*“Yo no he fracasado.
Sólo he encontrado
10.000 maneras que no funcionan”*

Thomas A. Edison

5. RESULTATS.

En aquesta Tesi s'ha descrit la microanatomia del nervi ciàtic de les espècies animals estudiades i s'han analitzat les semblances i diferències respecte el nervi ciàtic humà.

També s'ha aconseguit valorar l'efectivitat de la sang heparinitzada com un marcador apropiat per a l'estudi dels fenòmens que ocorren en una injecció intraneural respecte l'ús de la tinta xinesa.

I, per últim, s'han analitzat els fenòmens microanatòmics ocorreguts després d'una injecció intraneural deliberada de sang heparinitzada en model humà i animal.

A continuació detallarem els resultats obtinguts en aquesta Tesi diferenciats per estudis:

Resultats

5.1 Estudi 1.

En l'estudi de validació de l'espècie animal més compatible, es va realitzar una anàlisi anatòmica i morfològica del nervi ciàtic en 6 espècies de mamífers (rata, conill, porc, ovella, gos i humana).

- Estudi ecogràfic

L'estudi ecogràfic de les espècies va permetre identificar el nervi ciàtic, determinar el seu recorregut anatòmic en l'extremitat posterior/inferior i obtenir les característiques morfològiques del mateix: valors numèrics de l'àrea total i diàmetres majors i menors del nervi. Així mateix, pel fet de permetre un estudi dinàmic de la zona, es va poder evidenciar el punt de bifurcació del nervi en els seus dos components distals: nervi tibial i nervi peroneo comú.

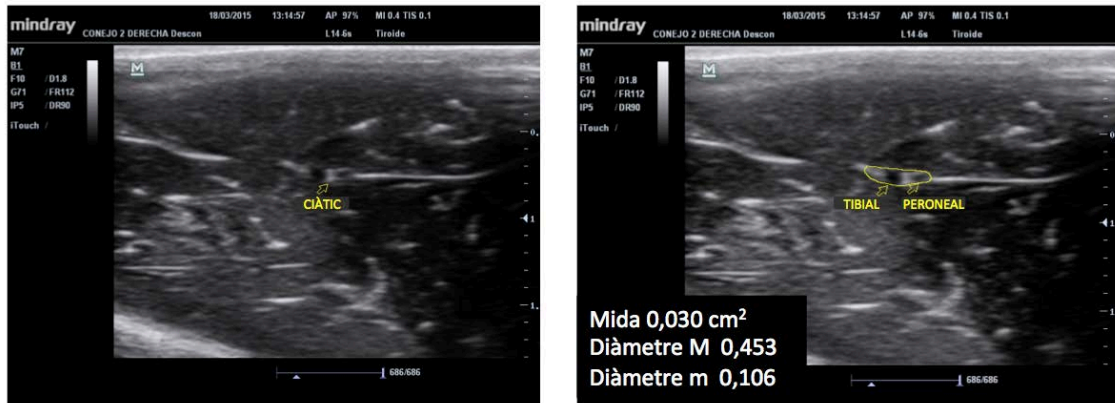
El material resultant d'aquesta experiència es va decidir no incloure'l en l'estudi publicat però sí incorporar-lo a la base de dades del grup investigador per futures publicacions.

En la següent imatge es pot observar el nervi ciàtic en el seu recorregut més proximal, entre les eminències òssies de la tuberositat isquiàtica i el trocànter, i en el seu recorregut més distal, previ a la seva divisió (Fotografia 16):



Fotografia 16. Identificació ecogràfica del nervi ciàtic en model oví. a: situació proximal, b: situació distal prèvia a la bifurcació.

En l'àrea de bifurcació del nervi es va capturar la imatge de pantalla de l'ecògraf i es va procedir a mesurar la mida total del nervi i el diàmetre major i menor (Fotografia 17):



Fotografia 17. Identificació i mesura ecogràfica de la mida del nervi (CSA), diàmetre major i menor en el model lagomorf.

En les espècies més petites (rata i conill), determinar el punt exacte de divisió va requerir més exactitud i es va corroborar per diferents investigadors per evitar un biaix.

El càlcul numèric es va realitzar en el nervi ciàtic de forma bilateral en ambdues extremitats posteriors/inferiors de totes les espècies animals excepte en el gos (per no disponibilitat de material) i pot consultar-se en la següent taula (Taula 4):

Resultats

		SEXE	PES(kg)	EDAT	EXTREMITAT	TAMANY NERVI (cm2)	Diàmetre major	Diàmetre menor
RATA (Cepa Wistar)	RATA1	Femella	0,29	8setmanes	DRETA	0,01	0,299	0,055
					ESQUERRA	0,012	0,312	0,069
	RATA2	Femella	0,31	9setmanes	DRETA	0,014	0,438	0,057
					ESQUERRA	0,01	0,255	0,062
	RATA3	Femella	0,28	9setmanes	DRETA	0,007	0,228	0,066
				ESQUERRA	0,01	0,233	0,06	
	RATA4	Femella	0,28	8setmanes	DRETA	0,01	0,263	0,065
				ESQUERRA	0,007	0,17	0,058	
	RATA5	Femella	0,3	9setmanes	DRETA	0,01	0,178	0,062
				ESQUERRA	0,01	0,194	0,062	
CONILL (New Zealand White)	CONILL1	Mascle	2,3	7setmanes	DRETA	0,03	0,484	1,02E-01
					ESQUERRA	0,03	0,461	1,12E-01
	CONILL2	Mascle	2,5	8setmanes	DRETA	0,028	0,391	1,01E-01
					ESQUERRA	0,029	0,495	1,14E-01
	CONILL3	Mascle	4,68	30setmanes	DRETA	0,03	0,437	1,01E-01
				ESQUERRA	0,025	0,4	8,10E-02	
	CONILL4	Mascle	5,06	30setmanes	DRETA	0,04	0,572	1,47E-01
				ESQUERRA	0,031	0,439	1,04E-01	
	CONILL5	Mascle	5,09	30setmanes	DRETA	0,026	0,445	1,08E-01
				ESQUERRA	0,05	0,628	1,16E-01	
PORC (Landrace+large white)	PORC1	Mascle	37	8setmanes	DRETA	0,2	1,016	2,43E-01
					ESQUERRA	0,165	0,994	2,47E-01
	PORC2	Femella	35	8setmanes	DRETA	0,177	0,971	2,51E-01
					ESQUERRA	0,217	1,2	2,54E-01
	PORC3	Femella	34	8setmanes	DRETA	0,198	1,038	2,24E-01
				ESQUERRA	0,175	1,154	2,48E-01	
	PORC4	Femella	35	8setmanes	DRETA	0,171	0,816	2,63E-01
				ESQUERRA	0,217	1,205	2,08E-01	
	PORC5	Femella	33	8setmanes	DRETA	0,192	1,064	2,03E-01
				ESQUERRA	0,205	1,175	2,33E-01	
OVELLA (Ripollesa)	OVELLA1	Femella	58	3anys	DRETA	0,143	0,721	2,79E-01
					ESQUERRA	0,144	1,13	1,92E-01
	OVELLA2	Femella	53	3anys	DRETA	0,168	1,158	2,77E-01
					ESQUERRA	0,193	1,219	2,19E-01
	OVELLA3	Femella	50,5	4anys	DRETA	0,174	1,175	2,42E-01
				ESQUERRA	0,195	1,066	2,35E-01	
	OVELLA4	Femella	49	4anys	DRETA	0,151	0,95	2,20E-01
				ESQUERRA	0,175	0,928	2,05E-01	
	OVELLA5	Femella	47	3anys	DRETA	0,276	1,39	2,20E-01
				ESQUERRA	0,274	1,239	2,33E-01	
HUMÀ	HUMÀ1	Home	80	46anys	DRETA	0,523	1,134	5,23E-01
					ESQUERRA	0,569	0,935	5,83E-01
	HUMÀ2	Dona	65	36anys	DRETA	0,52	0,994	5,74E-01
					ESQUERRA	0,57	0,9987	6,49E-01
	HUMÀ3	Dona	58	33anys	DRETA	0,586	1,184	5,39E-01
				ESQUERRA	0,537	0,937	5,95E-01	
	HUMÀ4	Home	65	27anys	DRETA	0,513	0,871	5,38E-01
				ESQUERRA	0,549	0,846	5,62E-01	
	HUMÀ5	Home	70	25anys	DRETA	0,716	1,044	6,66E-01
				ESQUERRA	0,762	1,242	7,43E-01	

Taula 4. Mesures de l'estudi ecogràfic dels nervis utilitzats en l'estudi 1.

Es va procedir a analitzar la relació entre les àrees i els diàmetres de cadascuna de les espècies per poder comparar-les amb l'humà, evidenciant-se una absència de relació (Figura 16):

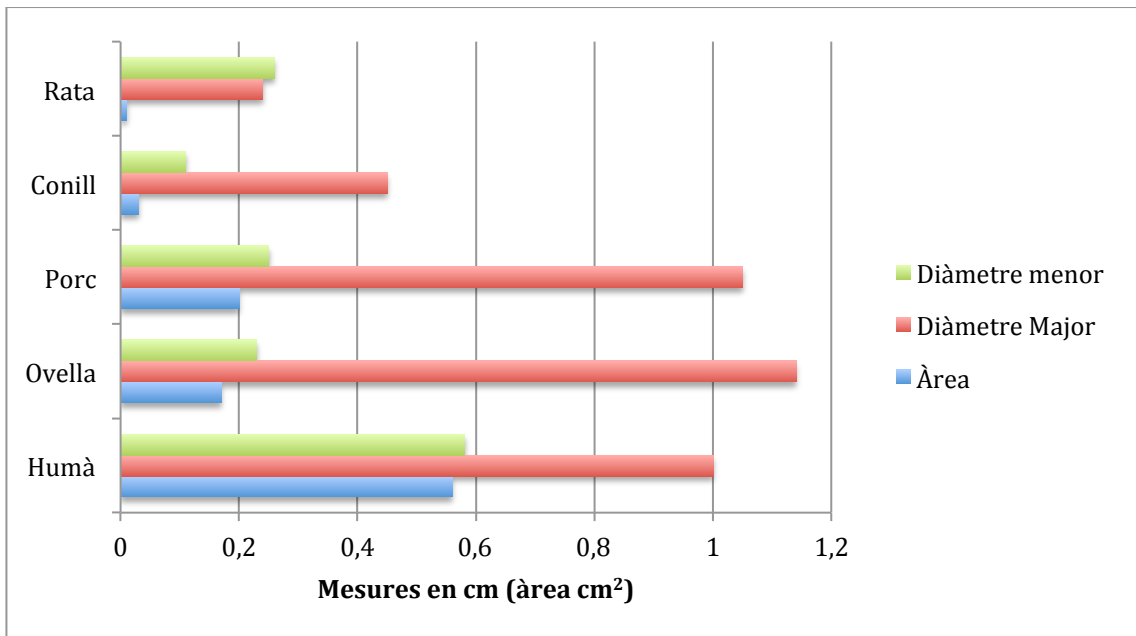
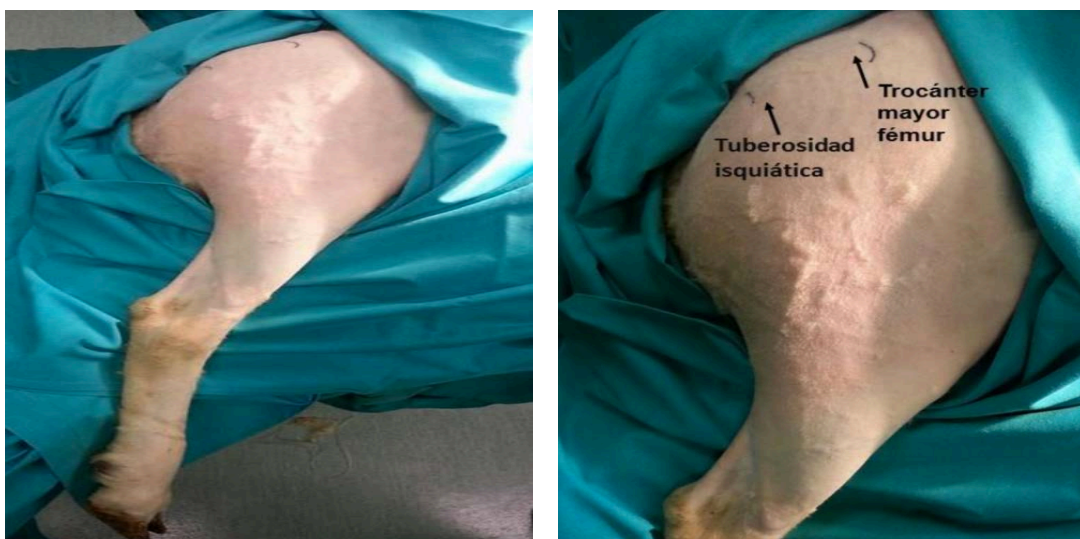


Figura 16. Relació dels diàmetres i mides del nervi ciàtic.

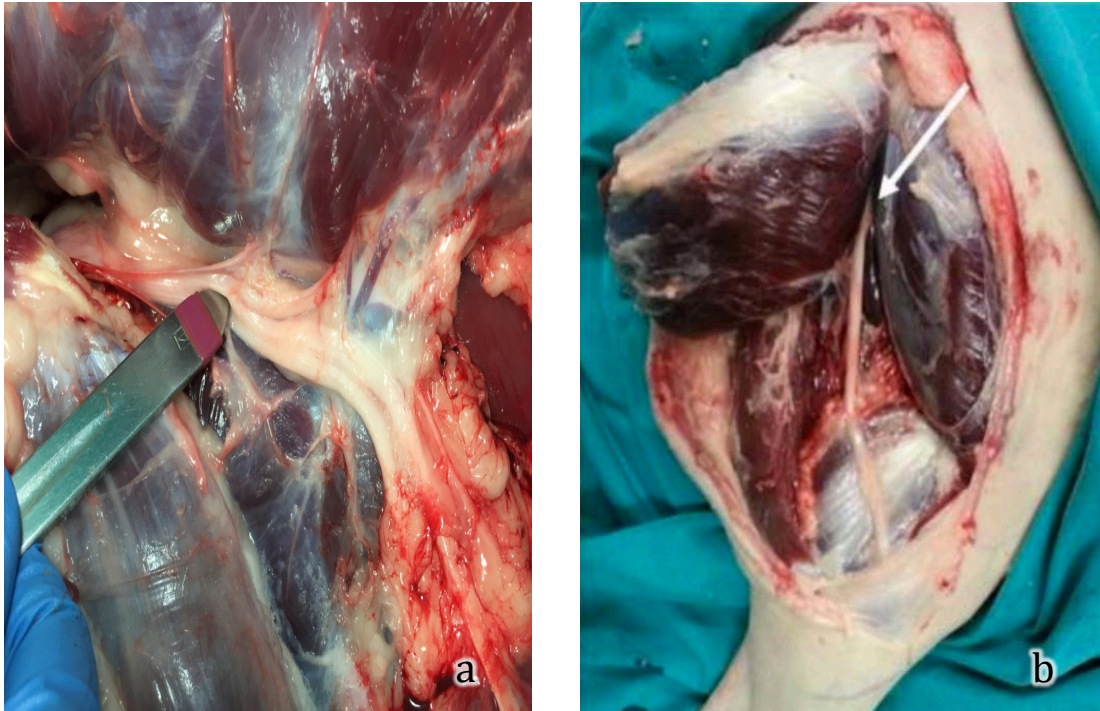
- Dissecció anatòmica

Es van delimitar les referències òssies anatòmiques per procedir a una dissecció dirigida (Fotografia 18 i Fotografia 19):



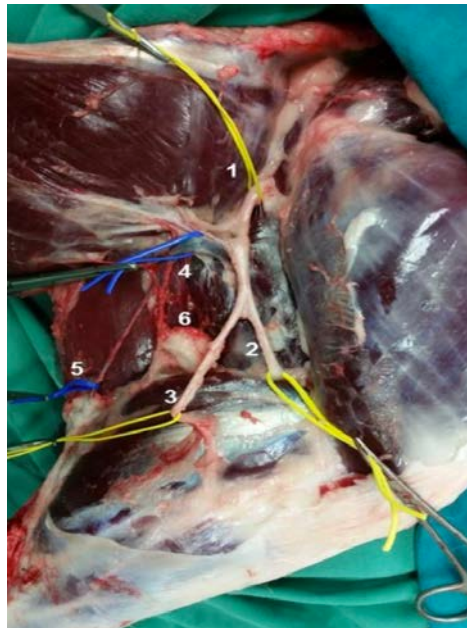
Fotografia 18. Membre pelvià de l'ovella, vista lateral. Identificació de les referències òssies: tuberositat isquiàtica i trocànter major del fèmur.

Resultats



Fotografia 19. Dissecció membre pelvià de l'ovella, vista lateral. a: identificació del nervi ciàtic sense dissecció total, b: dissecció del nervi ciàtic i de les branques (fletxa blanca).

Un cop identificat tot el paquet vasculo-nerviós, es va procedir a realitzar una dissecció i identificació de tots els components, tant del nervi i les seves divisions com d'artèries, venes i gangli popliti (Fotografia 20):



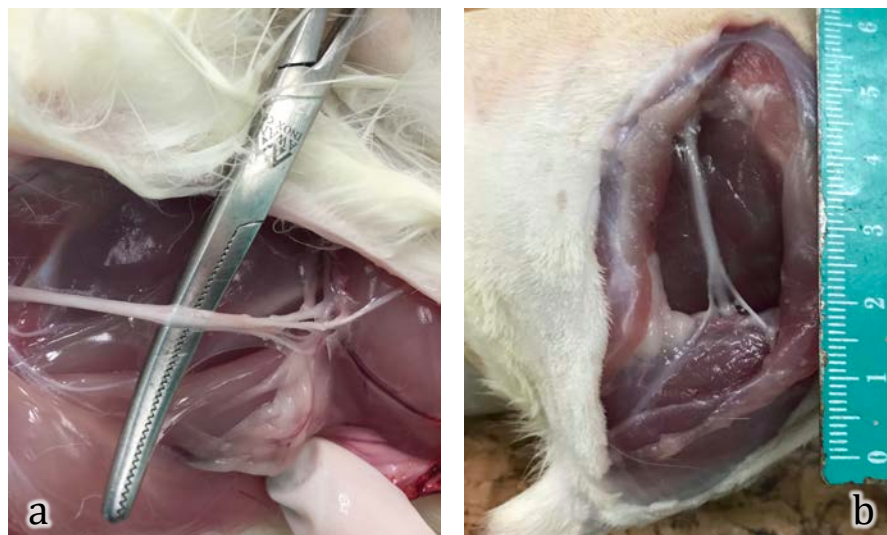
Fotografia 20. Membre pelvià de l'ovella, vista lateral, post desinserció del múscul gluti bíceps. El groc marca els nervis ciàtic (1), tibial (2), peroneo comú (3). El blau la vena femoral caudal (4) i la circumflexa mitja (5). S'observa el gangli popliti (6).

El teixit nerviós va ser meticulosament extirpat, evitant qualsevol distorsió de l'anatomia, i l'excés de greix i teixit connectiu del voltant del nervi van ser curosament retirats (Fotografia 21):



Fotografia 21. Nervi ciàtic de model porcí.

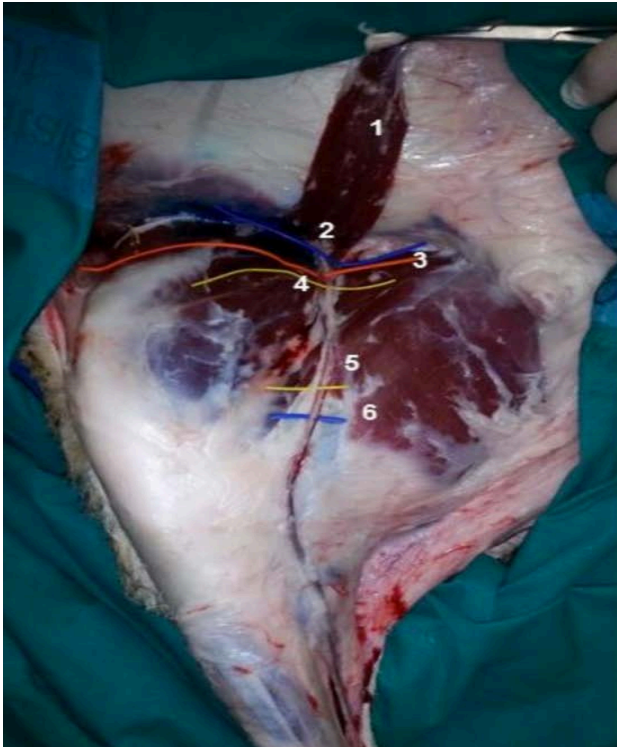
La longitud de la mostra obtinguda va dependre de l'espècie animal però en totes es va incloure la part proximal del nervi únic i la part de divisió en els dos components distals. Es poden observar les diferències òbvies de mida amb les espècies animals més petites (Fotografia 22):



Fotografia 22. Detalls anatòmics de la dissecció del nervi ciàtic de les espècies petites. a: conill, b: rata.

Resultats

A més a més, per completar l'estudi anatòmic i en previsió de futurs estudis, es va realitzar una dissecció de la part medial del membre pelvià del model oví (Fotografia 23).

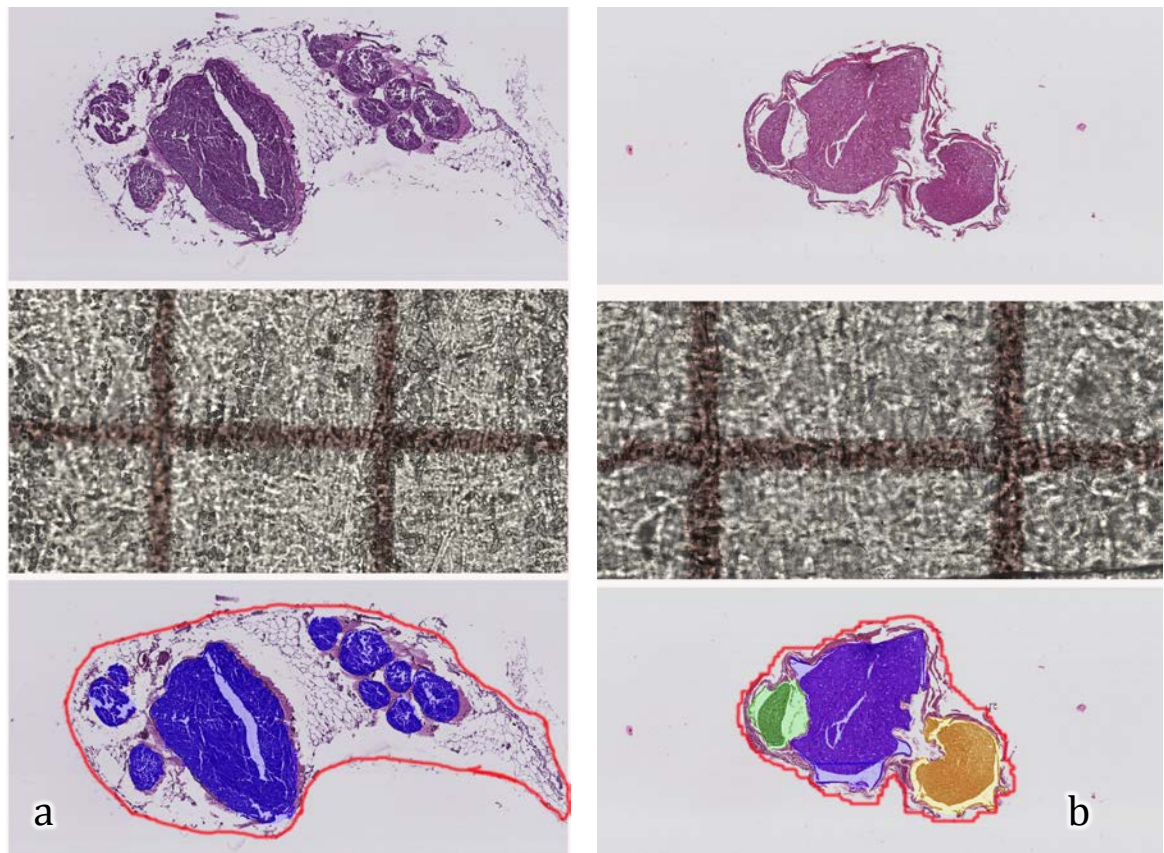


Fotografia 23. Membra pelvià oví, vista medial. 1: porció cranial múscul sartori, 2: vena femoral, 3: artèria femoral, 4: nervi femoral, 5: nervi safè, 6: vena safena.

- Anàlisi histològica

Es va realitzar un estudi exhaustiu de les característiques histològiques incloent: l'àrea de la secció transversal del nervi, el número de fascicles, l'àrea de la secció transversal del fascicle, la circumferència nerviosa, la circumferència del fascicle i la relació FA:TNA (relació de l'àrea de la secció transversal del fascicle amb l'àrea de la secció transversal del nervi total).

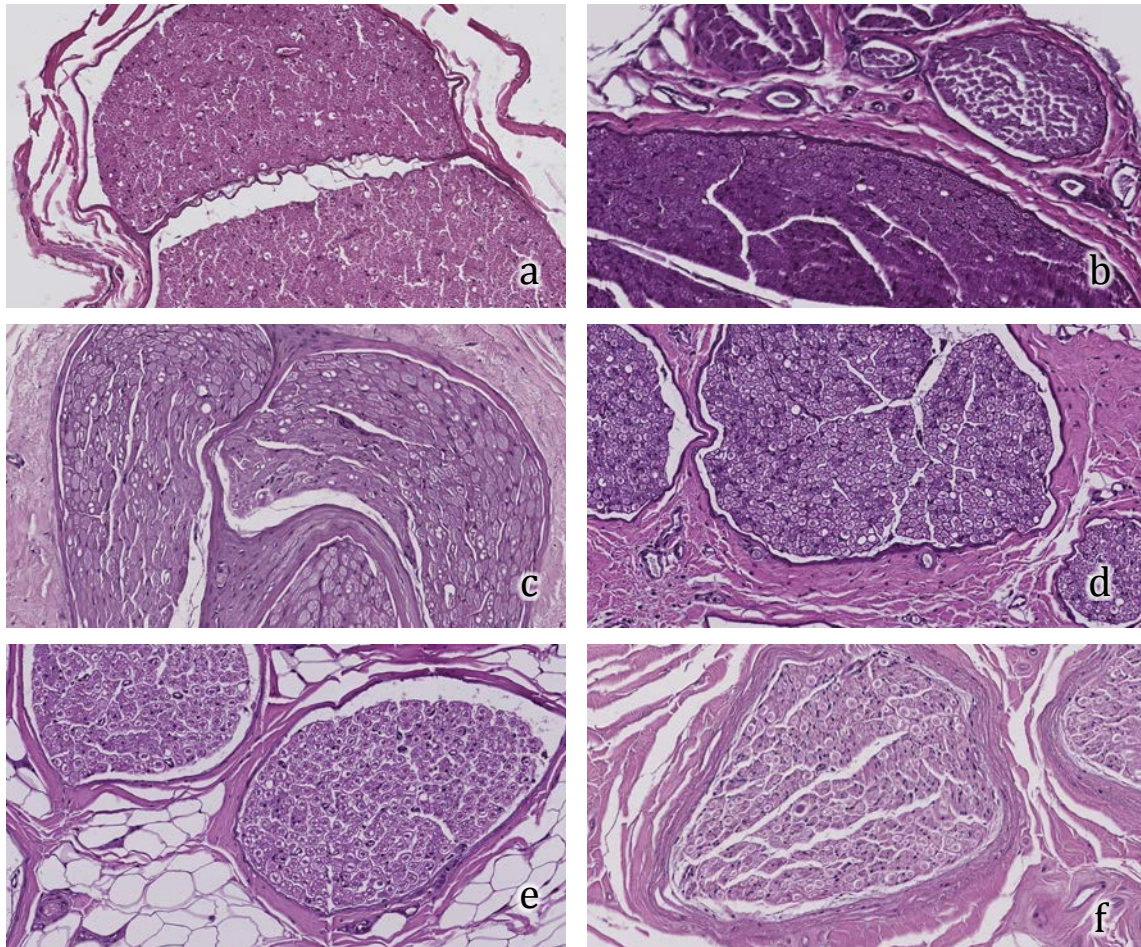
Totes les mesures van ser realitzades per un únic investigador, com s'ha comentat prèviament, per evitar disparitat de criteri (Fotografia 24).



Fotografia 24. Imatge histològica de nervi ciàtic de conill (a) i rata (b) amb matriu de mida.

Resultats

En les següents mostres histològiques es pot apreciar la diferència morfològica dels fascicles i axons de les diferents espècies (Fotografia 25):



Fotografia 25. Comparativa de nervis ciàtics de les 6 espècies animals, magnificació 400X.

(a: rata, b: conill, c: gos, d: porc, e: ovella, f: humà)

La gran majoria de les mesures i càlculs entre les espècies animals van mostrar diferències significatives. Tanmateix, entre parells de grups compartien certes similituds; la rata i el conill en quan a l'àrea de la secció transversal dels fascicles, la circumferència del fascicle, la relació FA:TNA i el número de fascicles; el conill i el gos en la relació FA:TNA; i entre el gos i el porc l'àrea de la secció transversal del nervi, circumferència nerviosa i relació FA:TNA.

Les medicions i càlculs de les 5 espècies animals van diferir significativament dels de l'humà, amb l'excepció de: rata a nivell de l'àrea de la secció transversal del

fascicle i la circumferència del fascicle, el gos en la relació FA:TNA i, per últim, el gos i l'ovella en el número de fascicles i la relació FA:TNA.

En comparació amb la mida dels fascicles dels humans, les rates semblaven similars, els porcs 4 vegades més petits, les ovelles i els conills 2 vegades més petits i els gossos 5 vegades més grans.

Pel que fa al percentatge de teixit neural, l'humà i el porc eren els que presentaven una menor proporció, mentre que l'ovella i el gos eren un 20% major i inclús el conill i la rata un 50% major al de l'humà.

Els resultats es poden evidenciar a continuació (Figura 17 i Figura 18):

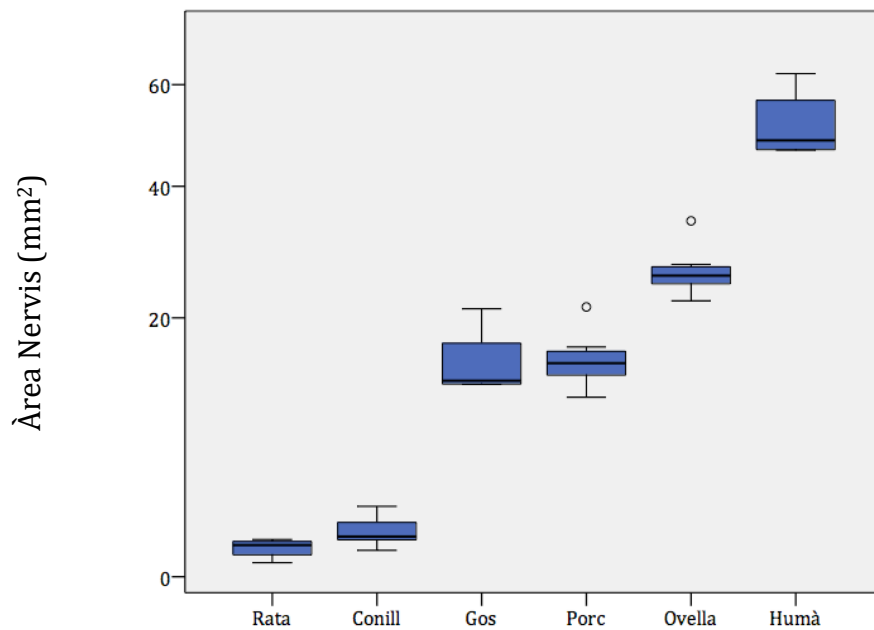


Figura 17. Box plot de l'àrea dels nervis de les diferents espècies.

Resultats

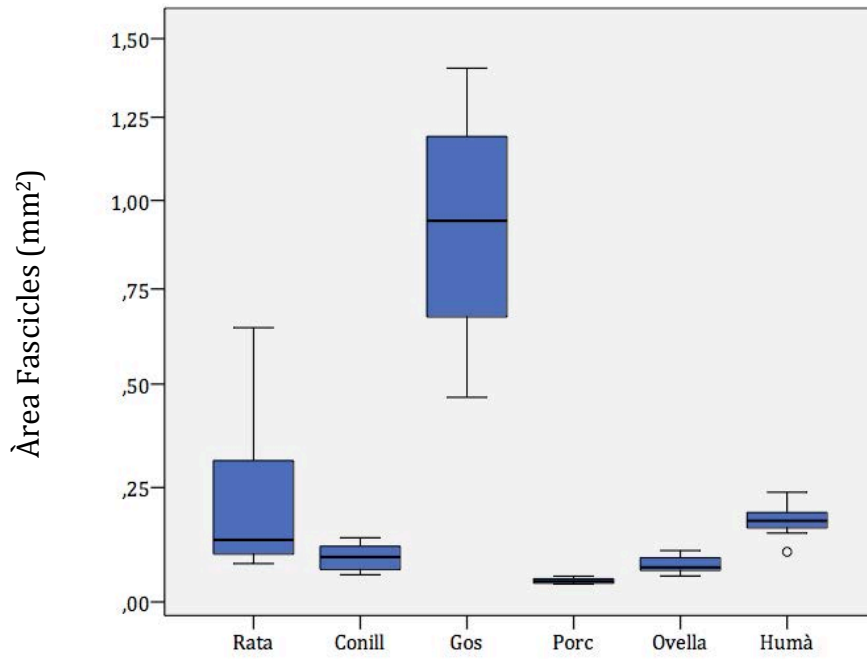


Figura 18. Box plot de l'àrea dels fascicles de les diferents espècies.

Cal destacar que es va fer una diferenciació entre les espècies multifasciculars (rata, conill i gos) i les espècies monofasciculars (porc, ovella i humà) (Figura 19):

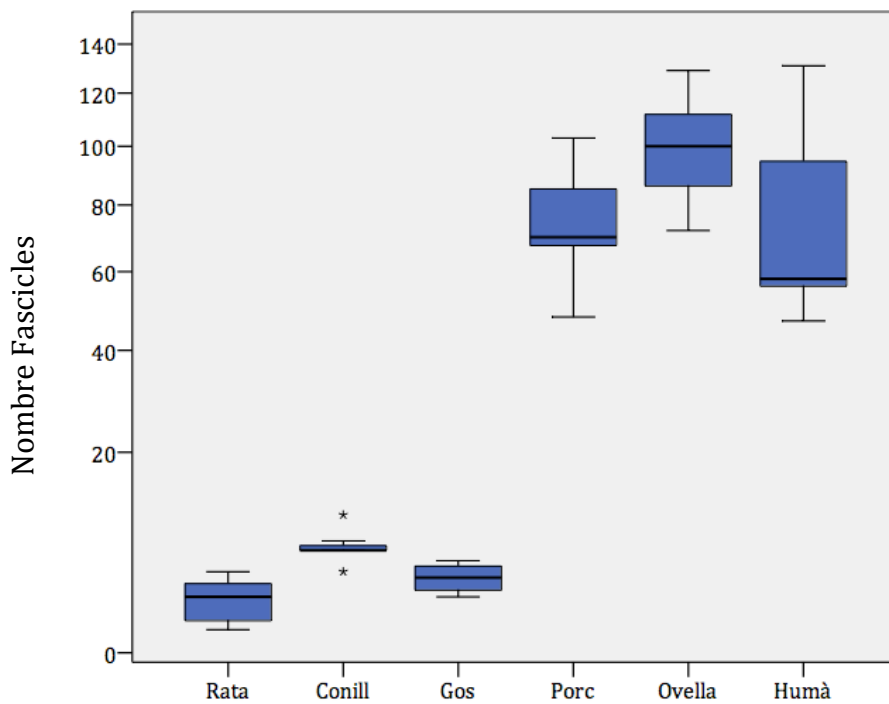


Figura 19. Box plot del nombre de fascicles de les diferents espècies.

La variable de l'àrea del nervi ciàtic mesurada ecogràficament es va comparar amb la mateixa variable però amb mesura real per mostra histològica. Es pretenia determinar si el grau de precisió aportats per l'aparell d'ecografia i per l'investigador es correlacionava amb la variable determinada pel teixit real, és a dir, per la histologia (Figura 20):

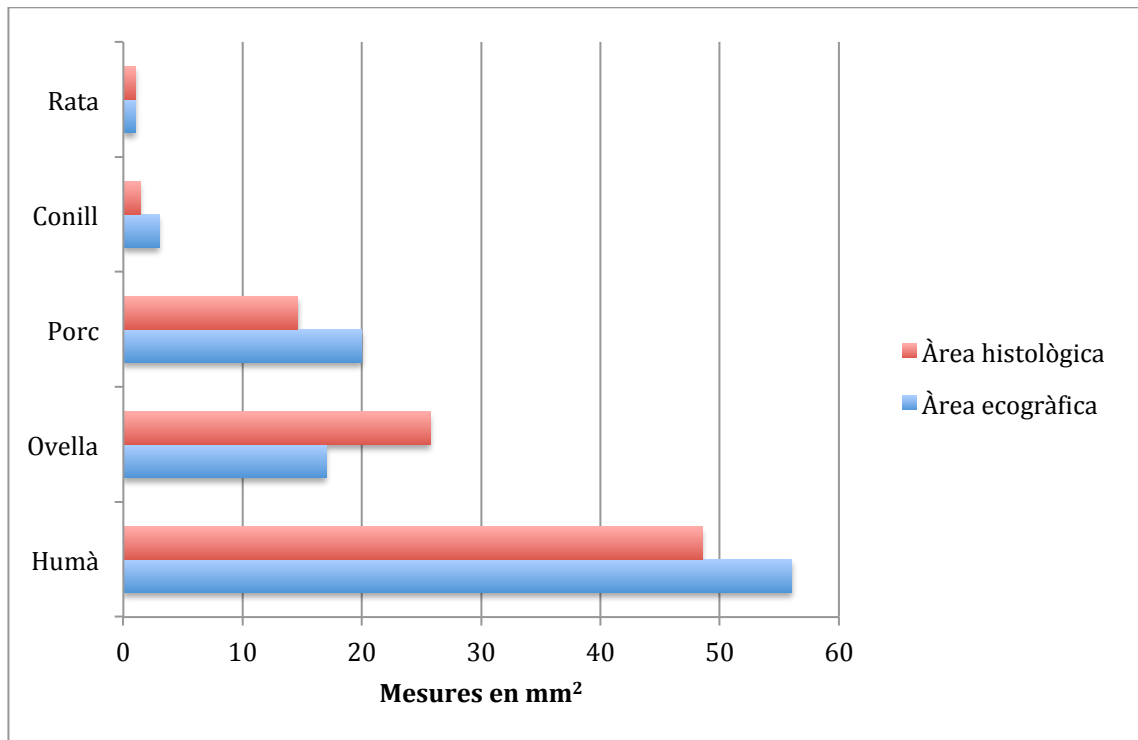


Figura 20. Relació entre l'àrea histològica i l'àrea ecogràfica de les diferents espècies.

5.2 Estudi 2.

En el segon estudi, la sang heparinitzada com a nou marcador va permetre evidenciar els avantatges respecte l'ús de la tinta xinesa.

En les mostres on es va utilitzar la tinta xinesa, la distribució i els marges del marcador en les imatges van ser menys clars. No es van identificar petites partícules individuals de tinta xinesa sinó una aglomeració d'aquestes partícules, que provocava que els límits o les membranes no quedessin definits. En comparació amb el nou marcador, la tinta xinesa sobrepassava els límits de contenció per sobreiximent i de manera contrària, imatges que semblaven intraneurals, en repetir l'experiment amb el marcador hemàtic, no ho estaven.

Degut a que els eritròcits estaven heparinitzats amb altes dosis, es van mantenir tots com partícules independents, permetent identificar eritròcits en espais molt estrets com són els espais entre les làmines perineurals que formen el perineuri i encara més enllà, entre les làmines perineurals que formen septes incomplets de perineuri projectats cap a l'interior dels fascicles.

El nou marcador va permetre visualitzar diferents compartiments per dins i per fora del nervi; es podia observar l'extensió dins del compartiment on havia estat injectat.

Degut a la mida dels compartiments i a la mida d'orifici de l'agulla utilitzada, en ocasions l'orifici cavalcava entre més d'un compartiment i, per tant, el marcador entrava en diversos compartiments però de forma directa a través de l'agulla, no pas perquè hagués passat les fronteres limítrofs entre cadascun d'aquests compartiments per difusió.

El nou marcador quedava limitat pel paraneuri, per l'epineuri, pel perineuri i també per l'epimisi dels músculs. El marcador mantenia la morfologia original de cadascun dels seus eritròcits, que permetia la seva fàcil identificació, sense evidenciar-se acumulació d'eritròcits fent cap tap o coàgul (probablement per les altes dosis d'heparina usades).

Amb relació al perineuri i les làmines perineurals que el formen, es va observar que el nou marcador evidencia de forma clara i amb detall l'extensió del mateix

entre les làmines perineurals. Aquest fet no era fàcilment identificable amb l'ús de la tinta xinesa.

Cal destacar que el teixit adipós va proporcionar el medi ideal perquè l'extensió del nou marcador fos possible. Quan el teixit present entre els fascicles no era adipós sinó teixit fibrós ocupat per fibres de col·lagen entrelligades, els eritròcits no van poder travessar el medi. Tampoc es va evidenciar distribució del marcador dins de l'espessor del múscul ja que l'epimisi sí que va representar una barrera efectiva. En comparació, la tinta xinesa no va aportar millors dades de distribució.

En el teixit adipós que hem comentat anteriorment, no es va produir ruptura d'adipòcits ni deformació dels mateixos pel pas del marcador estenent-se a través del medi. Els adipòcits només van perdre l'ancoratge dins de l'estructura proteica que els sosté com si fossin un teixit i aquest fet va ser més fàcilment visualitzable amb el nou marcador que amb la tinta xinesa.

També considerem que cal destacar que els artefactes produïts durant el processament de les mostres van ser més fàcilment identificables gràcies a l'aspecte translúcid dels eritròcits i a que, com hem comentat, no es van produir aglutinacions. Per el contrari, la tinta xinesa, per la seva aglutinació, impossibilitava l'observació a majors augments i també evitava poder observar a través seu, perdent detalls d'informació.

Per aquest fet i valorant els resultats de l'estudi, considerem que l'ús del nou marcador aporta avantatges importants a l'hora d'interpretar imatges histològiques com és el fet de poder observar de forma més detallada i a major augment les imatges.

Les imatges de l'estudi 2 i 3 es presentaran de forma conjunta en els resultats de l'estudi 3, atès que els resultats estan molt relacionats entre si i permeten entendre de forma visual els resultats d'ambdós estudis.

5.3 Estudi 3.

En la tercera part del nostre estudi es va plantejar l'ús d'HBS en cadàver humà i animal com a marcador d'injecció intraneural per avaluar els fenòmens microanatòmics després de realitzar injeccions intraneurals deliberades.

En el cas de l'humà, es va intentar realitzar una injecció intraneural deliberada ecoguiada. Es va assumir, tal i com es fa en la pràctica clínica habitual, que la imatge de "donut" corresponia a una injecció extraneural pròpia d'un bloqueig estàndard i el *swelling* corresponia a una injecció intraneural.

En el cas de les espècies animals, es va realitzar sota visió directa i cal mencionar que en les espècies petites (rata i conill) va ser tècnicament impossible realitzar les injeccions intraneurals amb les agulles de neuroestimulació usades. Lògicament aquest fet és degut a l'escassa mida de l'àrea del nervi en comparació amb l'àrea de les agulles utilitzades.

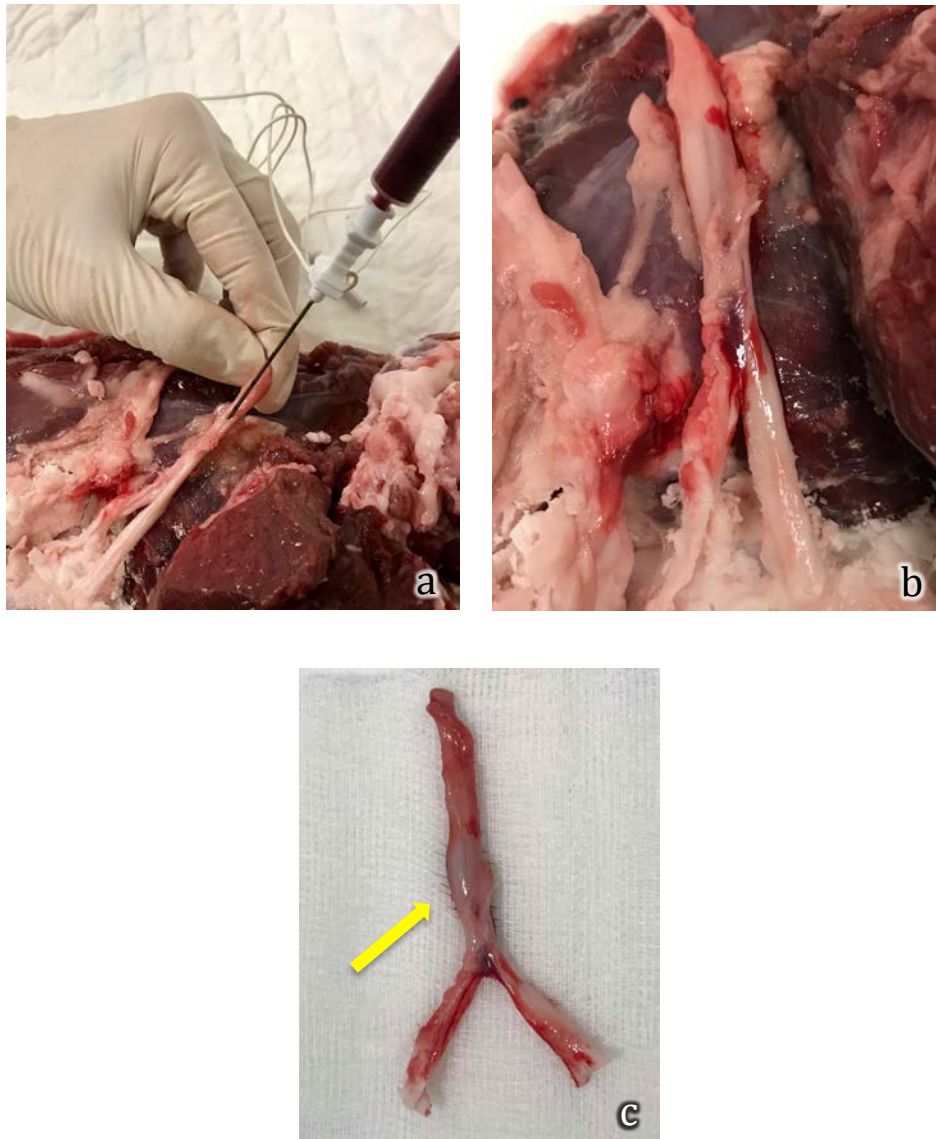
El HBS es va identificar per dins i per fora del nervi malgrat que la intenció va ser realitzar una injecció intraneural i es va confirmar pel *swelling* del nervi (en el cas de l'humà).

El marcador va ser observat dins del nervi i en els compartiments grassos que es troben per fora limitats per l'epimisi dels músculs propers i alguna membrana de circumneuri. Per una altra banda, per dins del nervi, el marcador es va identificar dins del teixit gras localitzat entre els fascicles però molt ocasionalment dins dels fascicles, tot i haver intentat realitzar punxions intraneurals. El marcador HBS no va aconseguir entrar dins de l'endoneuri dels fascicles. Es van observar un gran nombre de cèl·lules HBS omplint el gruix entre les capes del perineuri, que semblaven engruixides.

La propagació extrafascicular de la solució injectada intraneural es va observar en totes les mostres excepte en aquelles que no tenien greix entre els fascicles. Es va observar extensió subepineural del marcador entre els fascicles i fora del perineuri, entremesclats entre els adipòcits interfasciculars. En tots els casos els eritròcits desplaçaven i separaven els adipòcits prèviament units, sense trencar-los ni deformar-los. L'epineuri, perineuri i els axons tampoc es van trencar ni deformar després de les injeccions intraneurals.

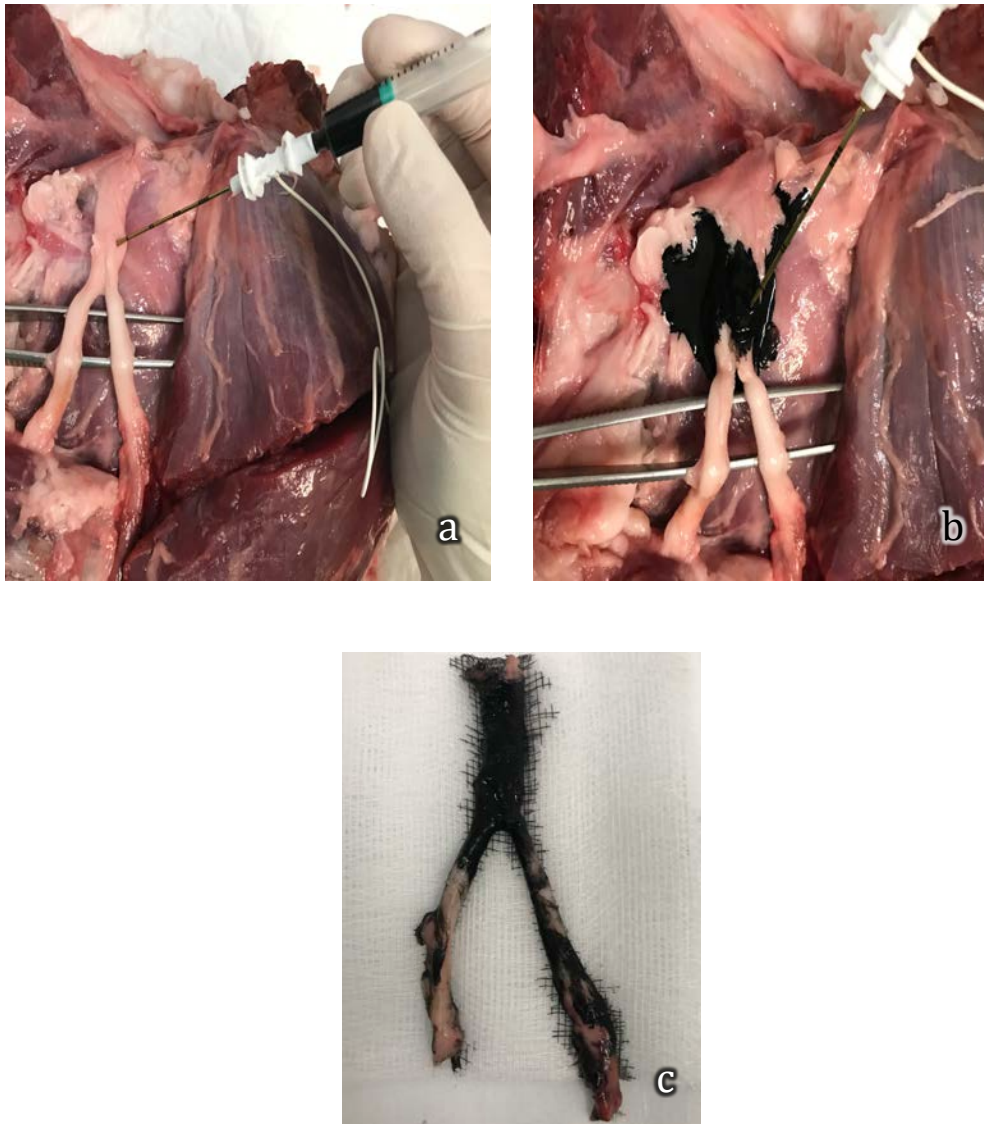
El marcador injectat de forma intraneural va produir una extensió longitudinal de la solució d'uns 36mm per fora dels fascicles en les direccions proximals i distals. Tanmateix, no es va produir extensió intrafascicular en cap de les mostres.

I, per últim, es va poder evidenciar la diferència macroscòpica entre el comportament del HBS i la tradicional tinta xinesa, com es pot observar a continuació (Fotografia 26 i Fotografia 27):



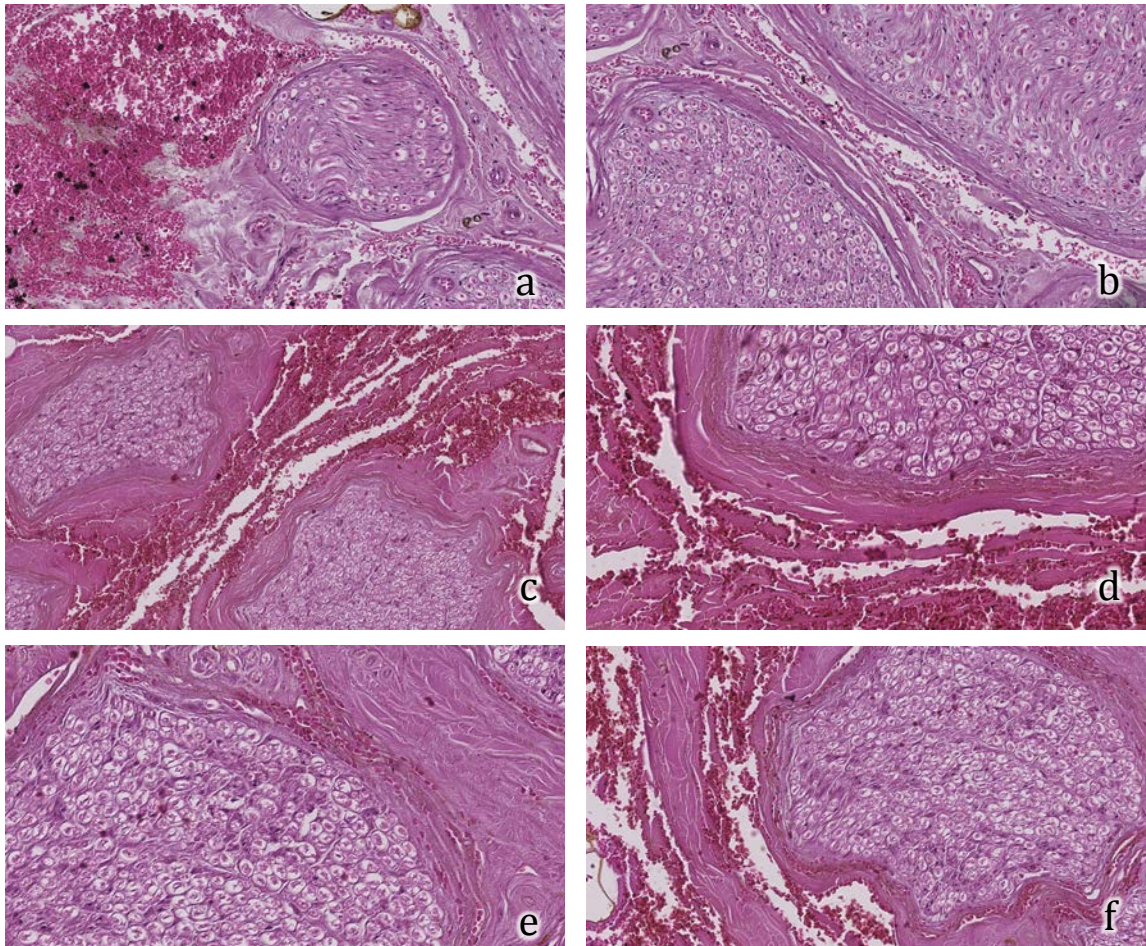
Fotografia 26. Experiment d'injecció d'HBS en ciàtic d'ovella. a: injecció, b: difusió localitzada, c: detall del "swelling" del nervi (fletxa groga).

Resultats



Fotografia 27. Experiment d'injecció de tinta xinesa en ciàtic d'ovella. a: injecció, b: difusió amb extravasació important, c: nervi ciàtic injectat.

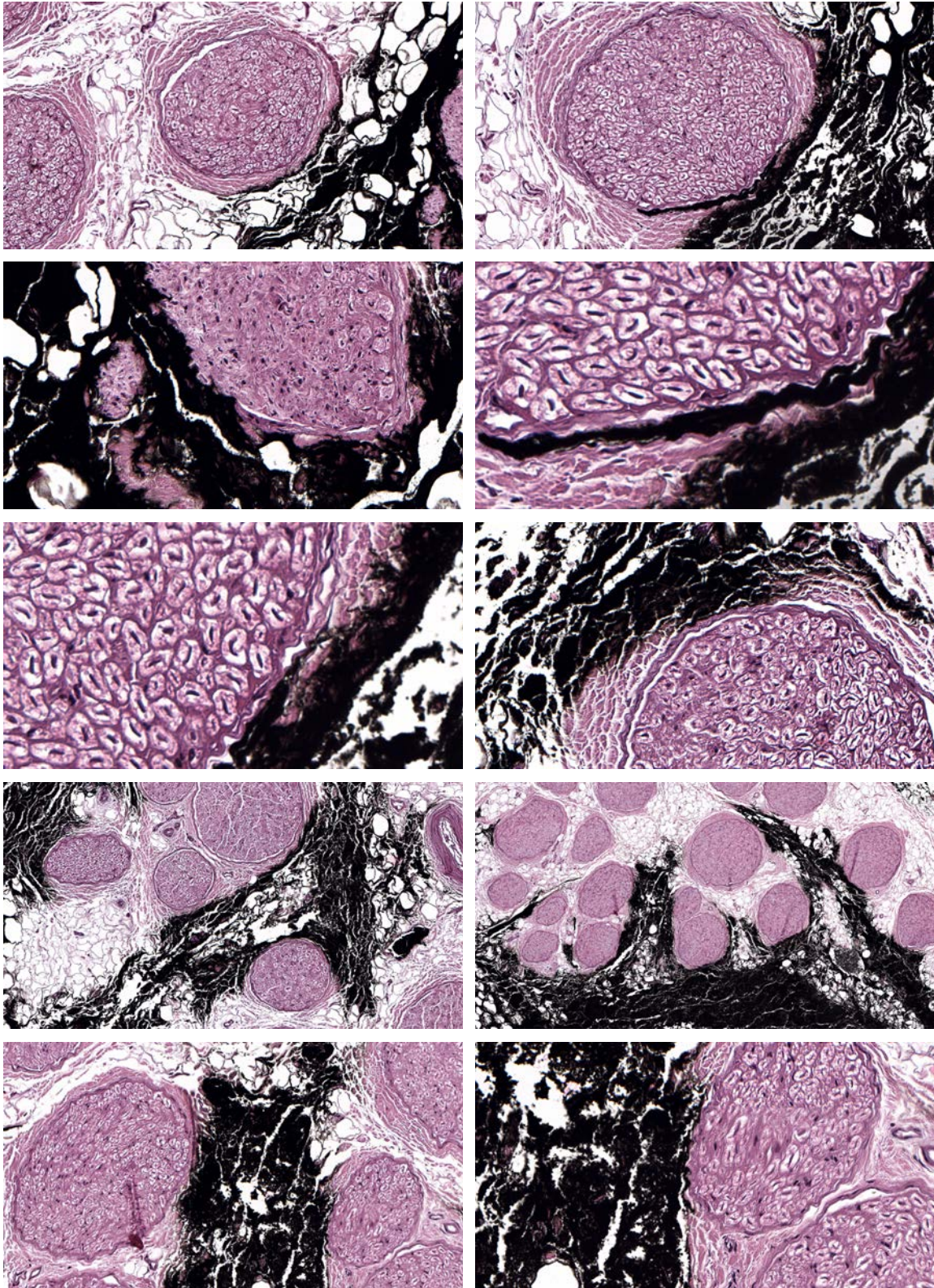
En la següent mostra de fotografies histològiques, es pot observar en l'estudi 2 (realitzat en diversos nervis de cadàvers humans) la distribució delimitada del HBS durant les injeccions nervioses, sense produir-se extravasacions (Fotografia 28):



Fotografia 28. Estudi 2: Nervi ciàtic humà i nervi medià humà. Detalls del comportament del HBS (imatges vermelles) en nervi ciàtic (a, b) i nervi medià humà a nivell supracondili (c, d, e, i f).

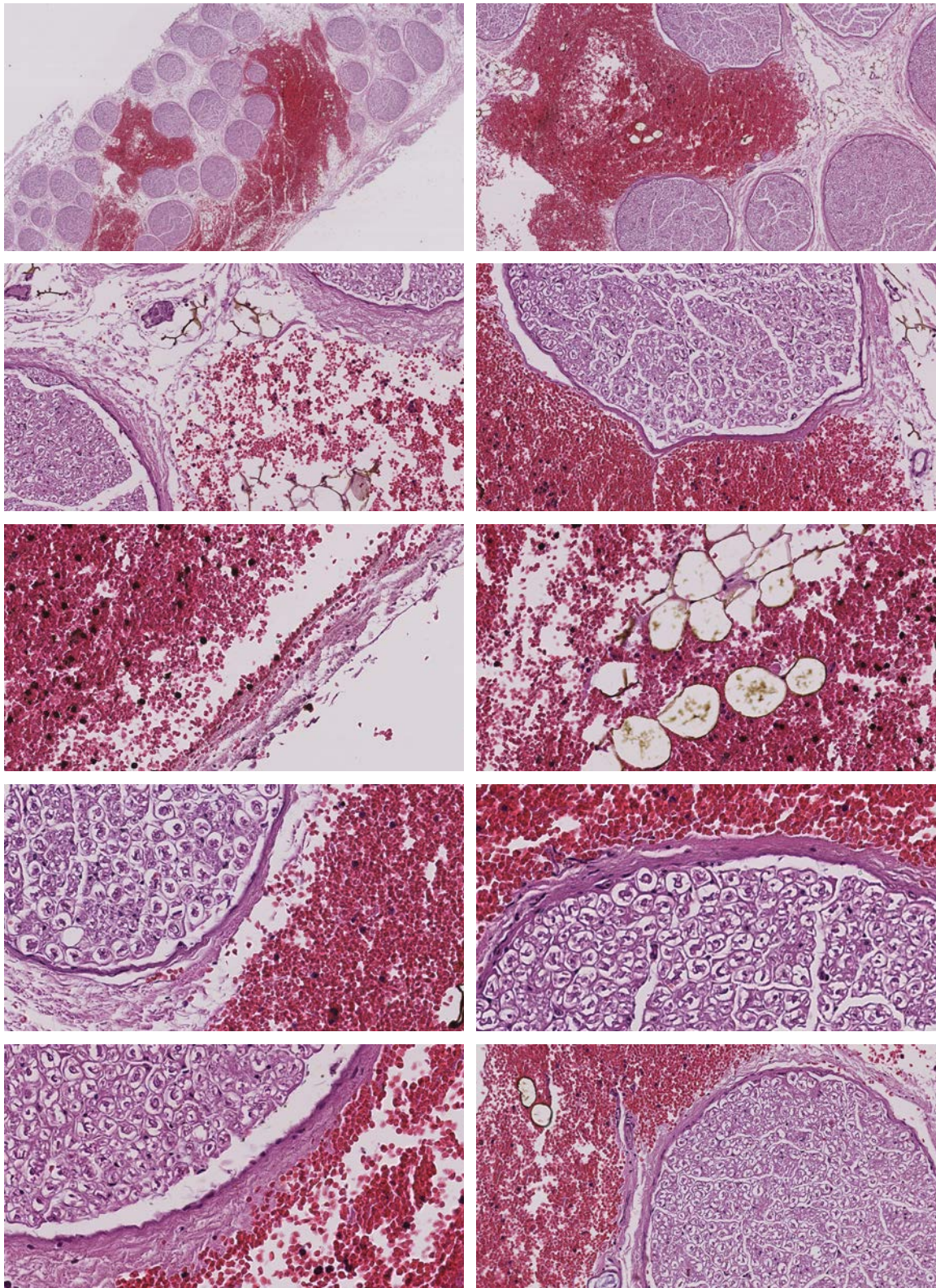
Resultats

A continuació, presentem mostres histològiques de l'estudi 3 (en model oví), on es pot observar la distribució irregular i l'extravasació a diferents compartiments de la tinta xinesa (Fotografia 29):



Fotografia 29. Estudi 3: Nervi ciàtic de model oví. Detalls del comportament de la tinta xinesa (imatges negres) en realitzar les injeccions intraneurals.

I, per últim, i a mode comparatiu, presentem mostres anàlogues de l'estudi 3 utilitzant l'HBS, on es pot observar una millor limitació de la distribució i una major nitidesa en la visualització dels compartiments (Fotografia 30):



Fotografia 30. Estudi 3: Nervi ciàtic de model oví. Detalls del comportament del HBS (imatges vermelles) en realitzar les injeccions intraneurals.

Publicacions Originals

*“No juzgues cada día por lo que cosechas,
sino por las semillas que plantas”*

Robert Louis Stevenson

6. PUBLICACIONS ORIGINALS.

6.1 Publicació original 1.

Server A, Reina MA, Boezaart AP, Prats-Galino A, Esteves Coelho M, Sala-Blanch X.

Microanatomical Nerve Architecture of Six Mammalian Species: Is Trans-Species

Translational Anatomic Extrapolation Valid? Reg Anesth Pain Med
2018;43(5):496-501.

Revista: Regional Anesthesia Pain Medicine

Factor d'impacte (Journal Citation Report - JCR (2017): 4.382

Ordre d'autor: Primer de sis

Categoria en JCR: Anesthesiology

Ordre en l'especialitat: 5 de 31 revistes

Categoria en quartils: Primer quartil (Q1)

Editorial: Lippincott Williams & Wilkins,

Two Commerce SQ, 2001 Market ST, Philadelphia, PA 19103 EEUU

ISSN: 1098-7339 eISSN: 1532-8651

Regional Anesthesia and Pain Medicine

Microanatomical Nerve Architecture of Six Mammalian Species: Is Trans-Species Translational Anatomic Extrapolation Valid?

Manuscript Number:	RAPM2017-567R1
Full Title:	Microanatomical Nerve Architecture of Six Mammalian Species: Is Trans-Species Translational Anatomic Extrapolation Valid?
Article Type:	Original Article
First Author:	Anna Server, MD
Order of Authors:	Anna Server, MD Miguel A Reina, MD, PhD André P. Boezaart, M.D., Ph.D. Alberto Prats-Galino, MD, PhD Marielle Esteves Coelho, MVD, PhD Xavier Sala-Blanch, MD
Order of Authors Secondary Information:	
Abstract:	<p>Background: Various animal models have historically been used to study iatrogenic nerve injury during performance of conduction nerve blocks. Our aim was to compare the microstructures of nerves in commonly used species to those of humans and to explore the validity of the extrapolating these findings to humans.</p> <p>Methods: High-resolution, light-microscopic images were obtained from cross sections of sciatic nerves at their bifurcation from fresh rat, rabbit, pig, sheep, dog, and human cadavers. Various microanatomical characteristics were measured and compared between the species. $P < 0.0033$ indicated significant differences.</p> <p>Results: Forty-four samples were studied. There were some interspecies similarities, but the majority of the microanatomical measurements of all 5 species differed significantly from those of humans. Exceptions were rat fascicle cross-sectional area ($P = 0.367$) and fascicle circumference ($P = 0.396$); ratio of dog, pig, and sheep fascicle area to total nerve area (dog: $P = 0.350$; pig: $P = 0.958$; sheep: $P = 0.052$); and number of fascicles (pig: $P = 0.454$; sheep $P = 0.077$).</p> <p>Conclusions: Although some of the metrics could reasonably be expected to differ because of the size of the species –for example, nerve cross-sectional area– there was little microanatomical similarity between the sciatic nerves of humans and those of the nonprimate mammalian species studied. This may question the validity of some conclusions reached over the years by direct translation from these species to humans. Further studies on nerve function, intraneural injection, and microanatomy of non-human primate species are warranted.</p>

Efforts to accelerate translational research necessitate a critical assessment of current animal models and experimental approaches for validity to the human condition. The aim of translational research is to transfer or extrapolate knowledge obtained from experimental animals to humans. The development of new regional anesthesia techniques with ultrasound guidance has suggested that events of needle-nerve contact and even intraneural injection are frequent^{1,2} and perhaps even not harmful as judged by our limited clinical experience. Ultrasound has played a pivotal role in acquiring detailed gross macroanatomy knowledge of nerves. This new knowledge reopened the debate about the possible mechanisms associated with iatrogenic nerve injury presumably caused by regional anesthesia.^{3–7}

Various experimental animal models have been used for studying peripheral nerve blocks and specifically iatrogenic nerve injury during attempted nerve blocks. Because of its ease of access, the sciatic nerve in particular has traditionally been used extensively in animal models. The sciatic nerve of rodents has become a popular model for the research of neuropathic pain and studies focused on the compression (ischemia) and transection of the nervous tissue.^{8,9}

Most of the current knowledge, recommendations, and guidelines regarding iatrogenic nerve injury during peripheral nerve block—possibly caused by direct mechanical needle trauma, high pressure and ischemia, or local anesthetic toxicity after intraneural injection—have been extrapolated from experimental results obtained from species such as rats,¹⁰ rabbits,⁷ pigs,¹¹ and dogs.⁶ The appropriateness of these mammalian species as experimental models for nerve injury studies has not been challenged or disputed, nor have these studies been validated. To our knowledge, a comprehensive interspecies comparison study has not been conducted to validate them for extrapolation to human clinical practice, although rodent sciatic nerves have been compared.

The aims of this study were to compare the microanatomical architectural features of the sciatic nerves of 5 commonly used mammalian species to those of humans and to explore the validity of interspecies conclusions.

METHODS

After animal and human ethics committee approval (Animal Experimentation Ethics Committee of the Vall d'Hebron Research Institute [protocol 66/15] and CEIC of Grupo Hospitales Madrid [code 147-GHM]), light-microscopic images were analyzed in 6 groups: group 1 contained 4 Wistar rats, group 2 contained 4 New Zealand rabbits, group 3 contained 4 hybrid pigs, group 4 contained 4 Ripollesa sheep, group 5 contained 2 beagle dogs, and group 6 contained 4 fresh human cadavers (Table 1). The study was conducted in the Laboratory of Surgical NeuroAnatomy, Human Anatomy and Embryology Unit, Faculty of Medicine, Universitat de Barcelona, Barcelona, Spain; the samples were obtained from the Vall d'Hebron Research Institute, Barcelona, Spain, and the histological studies were performed at the Institute of Applied Molecular Medicine, School of Medicine, University of CEU San Pablo, Madrid, Spain.

The animals were managed according to the internationally accepted ethical “principles of the 3 R's” (replacement, reduction, refinement). Before surgical manipulation, the nonhuman subjects were killed by an overdose of sodium pentobarbital, and death by cardiac arrest was confirmed. Sciatic nerve dissections were performed bilaterally in 4 animals of each species (2 dogs due to limited availability).

Sciatic Nerve Excision

The sciatic nerves were dissected from the posterior compartment of the leg at the division into its 2 terminal branches, the tibial and common peroneal nerves. Nerve tissue was meticulously excised, avoiding any distortion of anatomy, and excess fat and connective tissue around the nerve were carefully removed.

Light Microscopy

In each specimen, several transverse cross-sectional slices of the nerves were made at their bifurcation. After excision, the samples were fixed in 10% buffered formaldehyde for 15 days. The tissue slices were then processed with paraffin wax, and 10 successive sections at 20- μm intervals (3 μm in thickness) were made using a microtome. The sections were stained with hematoxylin-eosin

under standard conditions and examined with a light microscope at an initial magnification of 800 (Leica DM5500 B microscope; Leica SCN Microsystems Wetzlar GmbH, Wetzlar, Germany). The images were captured with a camera (Leica DFC425; Leica SCN Microsystems Wetzlar GmbH), and images of the full cross sections were saved with a scanner (Leica SCN400 Slide Scanner; Meyer Instruments, Inc, Houston, Texas). A picture of each nerve sample was obtained for analysis (Fig. 1).

Histological Image Analysis

An image-processing program (ImageJ; National Institutes of Health, Bethesda, Maryland) was used to quantify several parameters: number, area, circumference, and radius of groups of fascicles, as well as individual fascicles. The nerve and fascicle cross-sectional areas were expressed in millimeters squared, and the circumferences and radii in millimeters. Taking into account that fascicles are irregular geometric structures most closely resembling an ellipse, the surface areas were calculated from the following formula: $area = \pi ab$, where a is the radius of the longest axis of the ellipse, and b that of the shortest axis. To indicate the fraction of nonneural tissue (mostly adipose tissue), the ratio of the fascicle cross-sectional area to the total nerve cross-sectional area (FA:TNA ratio) was then calculated by dividing the sum of the fascicle cross-sectional areas for each animal by the sum of the TNAs. Images were processed at equal magnifications, and all calculations were made by the same researcher (A.S.) to minimize performance bias.

Statistical Methods

Based on the characteristics of the study, 8 samples of the sciatic nerve from each species have been considered (4 samples of the sciatic nerve from dogs). Data were expressed as medians (25th–75th interquartile range). This FA:TNA ratio basically represented the number of adipose cells and, to a lesser extent, connective tissue in the sciatic nerves of each species. Group comparisons were performed using the Kruskal-Wallis test (H test). Because of the small sample sizes, post hoc pairwise comparisons were assessed with Mann-Whitney U exact tests. The Bonferroni-corrected significance threshold (for 15

pairwise tests) was set at $P < 0.0033$. Pairwise median differences were calculated using the Hodges-Lehmann estimator with 99.7% confidence intervals. All analyses were performed in JMP Pro 13 (SAS Institute, Inc, Cary, North Carolina).

RESULTS

Sciatic nerve samples were obtained from both legs of 6 experimental species. We analyzed a total of 44 samples (8 nerve samples each from rat, rabbit, pig, sheep, and human and 4 nerve samples from dog) of the proximal site of the sciatic nerve bifurcation into the tibial and common peroneal nerves.

The histological characteristics of the sciatic nerve, including nerve cross-sectional area (in millimeters squared), fascicle number (n), fascicle cross-sectional area (in millimeters squared), nerve circumference (in millimeters), and fascicle circumference (in millimeters) were measured (Table 2). The radii of the longest and shortest axis of the cross section of the whole nerve and fascicle cross sections were used to calculate the FA:TNA ratio. Interspecies differences observed are shown in Table 3.

The vast majority of measurements and calculations between the nonhuman species differed with the exception of rat-rabbit fascicle cross-sectional areas ($P = 0.054$), fascicle circumference ($P = 0.060$), and FA:TNA ratio ($P = 0.564$). Rat-rabbit fascicle numbers ($P = 0.005$) were also similar, as were rabbit-dog FA:TNA ratio ($P = 0.051$) and dog-pig nerve cross-sectional area ($P = 0.368$), nerve circumference ($P = 0.368$), and FA:TNA ratio ($P = 0.445$).

The measurements and calculations of all 5 species differed significantly from those of humans ($P < 0.0033$), with the exception of the rat-human fascicle cross-sectional area ($P = 0.367$) and fascicle circumference ($P = 0.396$), dog-human FA:TNA ratio ($P = 0.350$), pig and sheep-human fascicle number (pig: $P = 0.454$, sheep: $P = 0.77$), and pig and sheep-human FA:TNA ratio (pig: $P = 0.958$; sheep: $P = 0.52$). Furthermore, there was a distinction between oligofascicular species (rat, rabbit, and dog) and multifascicular species (pig, sheep, and human) (Fig. 1).

It was possible to classify the sciatic nerves of the different species as oligofascicular (rat, rabbit, and dog [3 ± 1.5 fascicles, 7 ± 2 fascicles, 4.5 ± 1.3 fascicles, respectively]) and multifascicular (pig, sheep, and human [75 ± 19 fascicles, 99 ± 20 fascicles, 75 ± 33 fascicles, respectively]). Compared with human samples, the number of fascicles was similar to pigs, whereas the sheep had 25% more fascicles per nerve, and the rabbits, dogs, and rats had 10, 17, and 26 times fewer fascicles per nerve, respectively.

Pigs had the smallest fascicles ($0.04 \pm 0.03 \text{ mm}^2$), whereas midsize fascicles were found in sheep and rabbit ($0.07 \pm 0.05 \text{ mm}^2$ and $0.1 \pm 0.15 \text{ mm}^2$, respectively) and large fascicles in rat and human samples ($0.15 \pm 0.16 \text{ mm}^2$ and $0.16 \pm 0.15 \text{ mm}^2$, respectively). Dogs also had large fascicles ($0.86 \pm 1.02 \text{ mm}^2$). When compared with humans' fascicles, the rats' seemed similar, the pigs' 4 times smaller, the sheep and rabbits' 2 times smaller, and the dogs' fascicles 5 times larger.

When the important percentage of fascicle cross-sectional area to nerve cross-sectional area was calculated, it revealed a low percentage of fascicular area (neural tissue) in humans ($23\% \pm 5\%$) and pigs ($22\% \pm 5\%$), whereas it was 20% higher than humans in sheep and dog species ($28\% \pm 4\%$ and $29\% \pm 9\%$, respectively) and 50% higher than humans in rabbit and rat species ($43\% \pm 9\%$ and $48\% \pm 11\%$, respectively).

DISCUSSION

In this study, the microanatomical architecture of the sciatic nerves of 5 animal species was studied and compared with that of the human sciatic nerve. Although some anatomical variations such as nerve cross section and circumference between large and small species are expected, the results indicated vast differences in nerve architectures in terms of the majority of the metrics analyzed, but especially in the proportion of FA:TNA ratios, which indicates a fraction of nonneural, mostly adipose, tissue thought to have a protective function. The use of a high-resolution light microscope scanner

allowed us to examine and analyze the samples at high magnification (Fig. 1, Table 2).

Based on the evidence of this study, it is unlikely that experimental studies conducted in any of these models would provide the same outcomes; more importantly, based on purely microanatomical measurements and calculations, it is questionable whether conclusions reached in such experiments could be accurately extrapolated to humans. There is also a distinct possibility that most of the conclusions concerning regional block properties (eg, onset time, block duration, intraneural distribution of injected solutions) as well as axonal trauma resulting from intraneural injections with different needle bevels and toxic or ischemic axonal injury may be significantly different among species. Such results and conclusions may be mostly invalid or at least should be interpreted with caution.

The similarities among species may vary depending on the focus of a specific study. For example, the circumference of the fascicles is more comparable between humans and rats than between humans and larger animals such as pigs or sheep. Furthermore, it would be essential to consider the area, circumference, and radii of fascicles when studying the effects and toxicity of local anesthetic agents on peripheral nerves. Specifically, the FA: TNA ratio should probably be taken into consideration when studying physical nerve lesions from direct nerve trauma. This ratio represents the amount of adipose tissue, which may play a protective role; thus, the more nonneural adipose tissue relative to neural tissue (axons), the less vulnerable a nerve should theoretically be to physical and possibly chemical or ischemic injury.

Needle size (external and internal diameter) relative to that of the nerve components and the design (bevel) of the needle points used in experiments are also important considerations. This fact is crucial for assessing the effects of intrafascicular or extrafascicular injections. Obviously, if the same needle is used in different species, even though the methodology used may be similar, there can be little or no correlation between these findings and those found in human clinical practice.

Finally, as suggested by the results of this study, the availability of a model should most likely not be the principal consideration for its selection. For example, larger animal species may not be the most appropriate species to extrapolate to humans, and as has been observed in the human sciatic nerve, the specific location of focus along the length of a nerve may also differ.¹²

The microanatomical features of the endoneurium,^{13,14} perineurium,^{15,16} and epineurium,¹⁷ as well as axon types, are comparable to those of the sciatic nerve in humans. Nevertheless, the characteristics of topograms, number, size, radius, and circumference of fascicles; organization of groups and subgroups of fascicles within a nerve; and relation of neural tissue (axon type, axonal area and endoneurium) to nonneural tissue (mainly connective and adipose tissue) are different among peripheral nerves in the species studied.^{18–20} Care therefore should be taken when generalizing conclusions about a particular nerve (usually the sciatic nerve) to all nerves.

Some studies of intraneural injections and possible nerve injury may show different results if they were conducted on different animal species. The definitions of monofascicular, oligofascicular, or polyfascicular alone fail to explain all of the variation that may occur between a fascicle or group of fascicles when a needle penetrates a nerve. Poor reproducibility of results, as well as failure to translate results to clinical trials in humans, may be closely linked to the fact that all conclusions reached in a laboratory study will be strongly related to the experimental animal model used. The validity of the model should probably be based purely on the resemblance to the microanatomical characteristics of humans.

Several studies conducted on particular experimental animal models have had a great clinical and even economic impact in the field of regional anesthesia. Selander et al,⁷ for example, studied the risk of fascicular lesion after nerve puncture in relation to the type of needle bevel (diameters 0.4–0.7 mm, long-bevel 14°, short-bevel 45°) in the rabbit sciatic nerve. They concluded that the risk of nerve fascicle lesion was greater with long-beveled needles and thus recommended the use of short-bevel needles for peripheral nerve blocks, and

an entire industry of nerve block needle design was built on these findings. Later on, Rice and McMahon¹⁰ presented a contradictory report with exactly the opposite findings based on a different study design using Wistar rats. These apparently contradictory findings of Selander et al⁷ and Rice and McMahon¹⁰ may both be correct, but they are limited by methodology, animal model used, and needle type, which were all distinct variables. Other industrial consequences followed. For example, in their quest to avoid intraneural injections, Hadzic et al⁶ and Kapur et al⁵ focused their research on the association between higher injection pressure and risk of neurologic injury in dogs. On the strength of these studies alone, the nerve block injection pressure monitoring device (BSmart; B. Braun Medical Inc, Bethlehem, Pennsylvania) has been developed and popularized.

Therefore, the challenge lies in finding the species most similar to humans in terms of sciatic nerve structure in order to conduct appropriate translational studies. The higher nonhuman primates come to mind, but to the best of our knowledge, there are no studies comparing the histology of these less-available animal species to humans. The data suggest that, when extrapolating animal experimental data to humans in translational research, researchers should specify what exactly they are extrapolating: nerve size cross-sectional area, decrease of nerve size after iatrogenic nerve injury or toxicity, fascicle size, or percentage of fascicle to TNA, for example. There seems to be no relationship between these variables between the different mammalian species we examined and between these animals and humans.

There are several limitations to this study. First is the obvious omission of nonhuman primate species and the small sample sizes. However, the number of samples we studied demonstrated the vast differences between the peripheral neural architecture of the species. Second, the ages of our human subjects, in contrast with those of the nonhuman species, were advanced, and in human samples, we may assume the amount of interfascicular connective tissue will increase during the aging process.^{21,22} We did not notice significant differences in nerve architecture between sexes, although it is

possible that such differences may exist. Furthermore, the limited number of specimens and the uneven distribution of sexes prevented us from drawing any meaningful conclusions from such a distinction in this study. Another shortcoming in our study was that it was not possible with the light microscopy we used to differentiate between or quantify myelination, glial cells, vascular bed, and the phenotype of the nerve fibers (sympathetic vs nonsympathetic). Further studies to address each of these shortcomings should be conducted. That said, primates, especially the higher nonhuman primates, are not readily available.

In conclusion, sciatic nerve architecture differs widely among the studied experimental models, from the oligofascicular species (rat, rabbit, and dog) to the multifascicular species (sheep, pig, and human). The variances refer not only to topograms but also to specimen size—the smallest being the rat and the biggest the sheep and human—size and number of fascicles, and the ratio of neural to nonneural tissue. We believe it remains an absolute necessity to define the most suitable experimental model to conduct meaningful and relevant translational studies in the field of regional anesthesia.

TABLES AND FIGURES

Table 1. Samples Used

Groups	Samples used (Specie)	n	Age	Weight	Sex (M:F)
1	Wistar rats	4	9 wk	0.290 kg	2:2
2	New Zealand rabbits	4	30 wk	0.470 kg	3:1
3	Hybrid pigs (Large White x Landrace)	4	8 wk	35 kg	1:3
4	Ripollesa sheep	4	3 y	50.5 kg	2:2
5	Beagle dogs	2	9 y	17.3 kg	2:0
6	Human fresh cadavers	4	70-82 y	≈70 kg*	3:1

*Human cadavers were not weighed, but their average weight was estimated to be 70kg.
M:F indicates male-to-female ratio.

Table 2. Measurements of Nerves and Fascicles Across Species

Species	Average Nerve Cross-Sectional Area, mm ²	Average Fascicle Number (n)	Average Fascicle Cross-Sectional Area, mm ²	Average Nerve Circumferencem m	Average Fascicle Circumferencem m	Fascicle Area/Total Nerve Area Ratio
Rat (n=8)	1.070 (0.65-1.23)	3 (1.25-4)	0.132 (0.099-0.385)	3.66 (2.86-3.93)	1.29 (1.11-2.17)	0.49 (0.37-0.57)
Rabbit (n=8)	1.424 (1.277-2.083)	3.5 (2-4)	0.095 (0.067-0.118)	4.23 (4.01-5.12)	1.77 (1.54-2.60)	0.42 (0.38-0.53)
Dog (n=4)	12.787 (12.431-19.150)	2 (2-2)	0.941 (0.574-1.300)	12.68 (12.5-15.44)	4.82 (3.78-5.97)	0.25 (0.23-0.38)
Pig (n=8)	14.652 (13.341-16.221)	2.5 (2-3.75)	0.043 (0.039-0.049)	13.57 (12.95-14.28)	6.56 (5.11-7.9)	0.24 (0.19-0.25)
Sheep (n=8)	25.701 (24.188-27.160)	5 (3.25-6.75)	0.073 (0.063-0.094)	17.97 (17.43-18.47)	6.15 (5.44-7.38)	0.28 (0.36-0.32)
Human (n=8)	48.557 (46.711 -57.211)	2.5 (2-3)	0.174 (0.153-0.195)	24.7 (24.23-26.81)	13.63 (11.69-15.89)	0.22 (0.20-0.27)
p	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001

TABLE 3. Post Hoc Pairwise Multiple Comparisons (Mann-Whitney U Exact Tests, $P < 0.0033$) With Hodges-Lehmann (HL) Median Differences (With 99.7% Confidence Intervals)

		Nerve Cross-Sectional Area, mm ²	Fascicle Number (n)	Fascicle Cross-Sectional Area, mm ²	Nerve Circumference, mm	Fascicle Circumference, mm	Fascicle Area/Total Nerve Area
Rat vs							
Rabbit	HL	-0.66 (-2.10 to 0.34)	-4 (-9 to 1)	0.04 (-0.04 to 0.58)	-1.06 (-2.88 to 0.58)	0.23 (-0.21 to 1.91)	0.05 (-0.17 to 0.28)
	P	0.006	<0.001	0.054*	0.005	0.060*	0.564*
Dog	HL	-11.89 (-20.74 to 11.12)	-2.00 (-5.00 to 2.00)	-0.78 (-1.32 to 0.18)	-9.34 (-14.0 to 8.45)	-2.04 (-3.20 to 0.43)	0.169 (-0.06 to 0.43)
	P	0.004	0.127*	0.008	0.002	0.008	0.034*
Pig	HL	-13.79 (-20.61 to 9.93)	-67 (-101 to 44)	0.09 (0.03 to 0.61)	-10.10 (-13.24 to 7.95)	0.56 (0.24 to 2.15)	0.27 (0.10 to 0.45)
	P	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001
Sheep	HL	-24.83 (-33.30 to 21.03)	-97 (-127 to 68)	0.06 (-0.01 to 0.58)	-14.48 (-17.52 to 12.83)	0.33 (-0.07 to 1.90)	0.19 (0.04 to 0.38)
	P	<0.001	<0.001	0.002	<0.001	0.003	<0.001
Human	HL	-47.69 (-61.60 to 45.43)	-55.5 (-129 to 43)	-0.04 (-0.13 to 0.48)	-21.57 (-24.84 to 20.22)	-0.18 (-0.58 to 1.39)	0.25 (0.04 to 0.45)
	P	<0.001	<0.001	0.367*	<0.001	0.396*	<0.001
Rabbit vs							
Dog	HL	-11.18 (-20.30 to 9.52)	-3 (-8 - 1)	-0.84 (-1.3 to 0.33)	-8.51 (-13.01 to 6.51)	-2.36 (-3.35 to 1.11)	0.15 (-0.13 to 0.31)
	P	0.002	0.006	0.002	0.002	0.002	0.051*
Pig	HL	-12.92 (-20.11 to 9.08)	-63 (-96 to 41)	0.05 (0.01 to 0.10)	-9.04 (-12.36 to 6.76)	0.36 (0.08 to 0.61)	0.21 (0.03 to 0.38)
	P	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001
Sheep	HL	-24.03 (-32.80 to 20.18)	-93 (-122 to 63)	0.02 (-0.04 to 0.07)	-13.60 (-16.66 to 11.58)	0.11 (-0.24 to 0.39)	0.16 (0 to 0.28)
	P	<0.001	<0.001	0.165	<0.001	0.3685	0.003
Human	HL	-46.68 (-61.10 to 43.94)	-51 (-124 to 40)	-0.08 (-0.17 to 0.01)	-20.59 (-23.96 to 18.22)	-0.40 (-0.79 to 0.07)	0.19 (0.03 to 0.34)
	P	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	0.001
Dog vs							
Pig	HL	-0.97 (-9.99 to 10.03)	-65 (-100 to 42)	0.90 (0.41 to 1.37)	-0.48 (-3.91 to 4.48)	2.69 (1.60 to 3.52)	0.03 (-0.03 to 0.29)
	P	0.368*	0.002	0.002	0.368*	0.002	0.445*
Sheep	HL	-12.82 (-21.58 to 1.07)	-95.5 (-126 to 66)	0.86 (0.36 to 1.35)	-5.14 (-8.21 to 0.41)	2.44 (1.25 to 3.38)	-0.02 (-0.10 to 0.20)
	P	0.002	0.002	0.002	0.002	0.002	0.671*
Human	HL	-33.52 (-49.98 to 25.51)	-54 (-128 to 41)	0.77 (0.23 to 1.30)	-11.73 (-15.51 to 7.91)	1.97 (0.69 to 3.05)	0.03 (-0.11 to 0.24)
	P	0.003	0.003	0.003	0.003	0.003	0.350*
Pig vs							
Sheep	HL	-11.12 (-20.69 to 3.85)	-29.5 (-63 to 26)	-0.03 (-0.07 to 0)	-4.41 (-7.72 to 1.42)	-0.25 (-0.47 to 0.05)	-0.04 (-0.17 to 0.03)
	P	<0.001	0.030	<0.001	<0.001	<0.001	0.007
Human	HL	-34.73 (-49.99 to 25.43)	11 (-64 to 48)	-0.13 (-0.20 to 0.06)	-11.34 (-15.06 to 7.86)	-0.76 (-1.03 to 0.38)	0 (-0.16 to 0.07)
	P	<0.001	0.454*	<0.001	<0.001	<0.001	0.958*
Sheep vs							
Human	HL	-23.53 (-37.14 to 12.74)	35 (-51 to 74)	-0.10 (-0.17 to 0.02)	-6.97 (-10.23 to 3.56)	-0.51 (-0.78 to 0.07)	0.05 (-0.06 to 0.13)
	P	<0.001	0.077*	<0.001	<0.001	<0.001	0.052*

*Indicates nonsignificant.

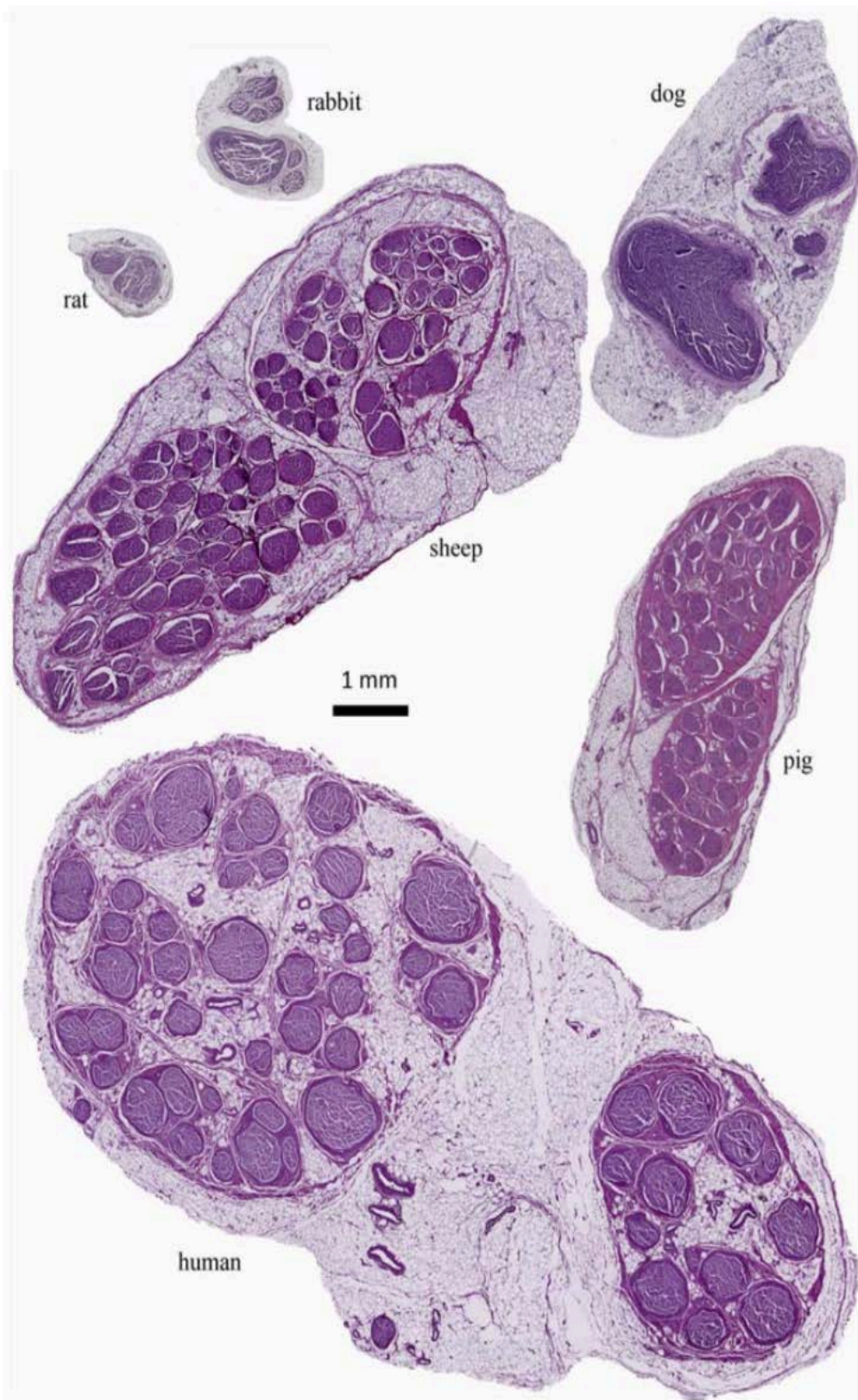


FIGURE 1. Comparative cross section of sciatic nerve from different species at same magnification (initially $\times 800$). Stained with hematoxylin-eosin.

REFERENCES

1. Steinfeldt T, Poeschl S, Nimphius W, et al. Forced needle advancement during needle-nerve contact in a porcine model: histological outcome. *Anesth Analg.* 2011;113:417–420.
2. Steinfeldt T, Graf J, Schneider J, et al. Histological consequences of needle-nerve contact following nerve stimulation in a pig model. *Anesthesiol Res Pract.* 2011;2011:1–9.
3. Hogan QH. Pathophysiology of peripheral nerve injury during regional anesthesia. *Reg Anesth Pain Med.* 2008;33:435–441.
4. Werdehausen R, Fazeli S, Braun S, et al. Apoptosis induction by different local anaesthetics in a neuroblastoma cell line. *Br J Anaesth.* 2009;103: 711–718.
5. Kapur E, Vuckovic I, Dilberovic F, et al. Neurologic and histologic outcome after intraneural injections of lidocaine in canine sciatic nerves. *Acta Anaesthesiol Scand.* 2007;51:101–107.
6. Hadzic A, Dilberovic F, Shah S, et al. Combination of intraneural injection and high injection pressure leads to fascicular injury and neurologic deficits in dogs. *Reg Anesth Pain Med.* 2004;29:417–423.
7. Selander D, Dhunér KG, Lundborg G. Peripheral nerve injury due to injection needles used for regional anesthesia. An experimental study of the acute effects of needle point trauma. *Acta Anaesthesiol Scand.* 1977;21: 182–188.
8. Seltzer Z, Dubner R, Shir Y. A novel behavioral model of neuropathic pain disorders produced in rats by partial sciatic nerve injury. *Pain.* 1990;43: 205–218.
9. Kingery WS, Vallin JA. The development of chronic mechanical hyperalgesia, autotomy and collateral sprouting following sciatic nerve section in rat. *Pain.* 1989;38:321–332.

10. Rice AS, McMahon SB. Peripheral nerve injury caused by injection needles used in regional anaesthesia: influence of bevel configuration, studied in a rat model. *Br J Anaesth.* 1992;69:433–438.
11. Chan VW, Brull R, McCartney CJ, Xu D, Abbas S, Shannon P. An ultrasonographic and histological study of intraneural injection and electrical stimulation in pigs. *Anesth Analg.* 2007;104:1281–1284.
12. Moayeri N, Groen GJ. Differences in quantitative architecture of sciatic nerve may explain differences in potential vulnerability to nerve injury, onset time, and minimum effective anesthetic volume. *Anesthesiology.* 2009;111:1128–1134.
13. Reina MA, Machés F, De Diego-Isasa P, Del Olmo C. Ultrastructure of endoneurium. In: Reina MA, ed. *Atlas of Functional Anatomy of Regional Anesthesia and Pain Medicine.* New York: Springer; 2015;37–58.
14. Reina MA, Arriazu R, Collier CB, Sala-Blanch X. Histology and electron microscopy of human peripheral nerves of clinical relevance to the practice of nerve blocks. *Rev Esp Anestesiol Reanim.* 2013;60:552–562.
15. Reina MA, Colman E, Diamantopoulos J, De Andrés JA. Ultrastructure of perineurium. In: Reina MA, ed. *Atlas of Functional Anatomy of Regional Anesthesia and Pain Medicine.* New York: Springer; 2015;59–84.
16. Reina MA, Sala Blanch X, Arriazu R, Machés F. Microscopic morphology and ultrastructure of human peripheral nerves. In: Tubbs RS, Rizk E, Shoja M, Loukas M, eds. *Nerves and Nerve Injuries.* San Diego, CA: Elsevier; 2015;91–104.
17. Reina MA, Sala-Blanch X. Ultrastructure of epineurium. In: Reina MA, ed. *Atlas of Functional Anatomy of Regional Anesthesia and Pain Medicine.* New York: Springer; 2015;85–98.
18. Reina MA, Fernández P, Machés F, Sala-Blanch X. Microanatomy of the sacral plexus and nerves of the lower extremity. In: Karmakar MK, ed.

Musculoskeletal Ultrasound for Regional Anesthesia and Pain Medicine. 2nd ed. Hong Kong: The Chinese University of Hong Kong; 2016;139–158.

19. Reina MA, Sala-Blanch X, Fernández P. Cross-sectional microscopic anatomy of dissected sciatic nerve. In: Reina MA, ed. Atlas of Functional Anatomy of Regional Anesthesia and Pain Medicine. New York: Springer; 2015;213–236.

20. Reina MA, Sala-Blanch X. Cross-sectional microscopic anatomy of sciatic nerve and paraneural sheaths. In: Reina MA, ed. Atlas of Functional Anatomy of Regional Anesthesia and Pain Medicine. New York: Springer; 2015;237–270.

21. Jacobs JM, Love S. Qualitative and quantitative morphology of human sural nerve at different ages. Brain. 1985;108:897–924.

22. Ceballos D, Cuadras J, Verdú E, Navarro X. Morphometric and ultrastructural changes with ageing in mouse peripheral nerve. J Anat. 1999;195:563–57.

Accepted manuscript

6.2 Publicació original 2.

Reina MA, Boezaart AP, Sala-Blanch X, Monzó E, Server A, Bigeleisen P. A novel marker for identifying and studying the membranes, barriers, and compartments surrounding peripheral nerves microscopically. Clin Anat 2018;31:1050-1057.

Revista: Clinical Anatomy

Factor d'impacte (Journal Citation Report - JCR (2017)): 1.908

Ordre d'autor: Cinquè de sis

Categoria en JCR: Anatomy

Ordre en l'especialitat: 7 de 21 revistes

Categoria en quartils: Segon quartil (Q2)

Editorial Willey-Black

111 River ST, Hoboken 07030, NJ EEUU

ISSN: 0897-3806

eISSN: 1098-2353

Original Communication

A Novel Marker for Identifying and Studying the Membranes, Barriers, and Compartments Surrounding Peripheral Nerves Microscopically

MIGUEL A. REINA ^{1,2} ANDRÉ P. BOEZAART ^{3*} XAVIER SALA-BLANCH ⁴
ENRIQUE MONZÓ,² R. SHANE TUBBS,⁵ ANNA SERVER,⁶ AND PAUL BIGEISEN⁷

¹CEU San Pablo University School of Medicine, Madrid, Spain

²Department of Anesthesiology, Madrid-Montepíncipe University Hospital, Madrid, Spain

³Departments of Anesthesiology and Orthopedic Surgery and Rehabilitation, University of Florida College of Medicine, Gainesville, Florida, USA

⁴Human Anatomy and Embryology Unit, Faculty of Medicine and Department of Anesthesiology, University of Barcelona, Barcelona, Spain

⁵Seattle Science Foundation, Department of Anatomical Sciences, St. George's University, Grenada

⁶Department of Anesthesiology, Hospital Universitari Vall d'Hebron, Barcelona, Spain

⁷Department of Anesthesiology, University of Maryland, Baltimore, Maryland, USA

Recent anatomical discoveries indicate the importance of identifying membranes and compartments surrounding peripheral nerves into which local anesthetic agents can be injected and continuous nerve block catheters placed during regional anesthetic procedures. However, current markers used in anatomical studies have multiple drawbacks, specifically extravasation into noninjected locations, which can result in inadequate treatment. We studied a readily-available new marker, heparinized blood solution (HBS), which is easy to identify by microscopy and can remain in the nerve compartment into which it is deposited without distorting the tissue. We collected blood from 22 patients and prepared it as HBS. This was then injected into four fresh cadavers as in routine clinical practice for ultrasound-guided nerve blocks to form a so-called "doughnut" by "hydro-dissecting" at 32 sites. All samples, including nerves and neighboring tissues, were then prepared and examined by light microscopy. Although no deliberate intraneural injection was attempted, the marker was identified inside all the nerve compartments except the fascicles. Apart from leaking through the needle entry site in some instances, there was no extravasation of the HBS into neighboring nerve compartments in either direction. The tissues were not distorted and the erythrocytes did not form a thrombus. Nerve membranes and compartments could be clearly identified with routine staining. This technique enabled us to study the longitudinal and circumferential spread in all nerve compartments and to collect data for better interpretation of factors influencing an anesthetic

*Correspondence to: André P. Boezaart, Department of Anesthesiology, University of Florida College of Medicine, 1600 SW Archer Road, PO Box 100254, Gainesville, Florida, USA 32610. E-mail: aboezaart@anest.ufl.edu

This research was supported by the CEU San Pablo University School of Medicine, Madrid, Spain and the Department of Anesthesiology, Madrid-Montepíncipe University Hospital, Madrid, Spain; the Department of Anesthesiology, University of Florida College of Medicine, Gainesville, Florida; Human Anatomy and Embryology Unit, Faculty of Medicine and Department of Anesthesiology, University of Barcelona, Barcelona, Spain; and Department of Anesthesiology, University of Maryland, Baltimore, Maryland. It received no specific grant from funding agencies in the public, commercial, or not-for-profit sectors.

The authors declare no conflicts of interests.

Received 28 June 2018; Revised 25 July 2018; Accepted 2 August 2018

Published online 00 Month in Wiley Online Library (wileyonlinelibrary.com). DOI: 10.1002/ca.23253

2 Reina et al.

nerve block and situations in which complications could possibly arise. HBS seemed superior to other markers because it did not leave the compartments into which it had been injected, did not distort the tissue, and was easily visible under the light microscope. *Clin. Anat.* 9999:1–8, 2018. © 2018 Wiley Periodicals, Inc.

Key words: peripheral nerve injuries; endoneurium; epineurium; perineurium; nerve blockade

INTRODUCTION

Recent anatomical studies have improved our understanding of nerve membranes, barriers, and compartments related to anesthetic nerve blocks (Anderson et al., 2012; Reina and Sala-Blanch, 2015; Reina et al., 2015; Karmakar et al., 2013) (Fig. 1). After available microanatomical knowledge of nerves and neighboring tissues was studied in depth, the potential importance of the compartment into which a local anesthetic agent

(LA) is delivered for single-injection nerve blockade was assessed. Furthermore, the compartment into which a catheter for a continuous peripheral nerve block (CPNB) is placed could be critical for its efficacy.

After the LA is injected for a nerve block, it spreads to form the first phase, in which the injected volume is deposited at a certain distance from the nerve. Diffusion of the LA toward the nerve axons to block their sodium channels is the second phase, and its absorption and removal (diffusion in the other direction) the third

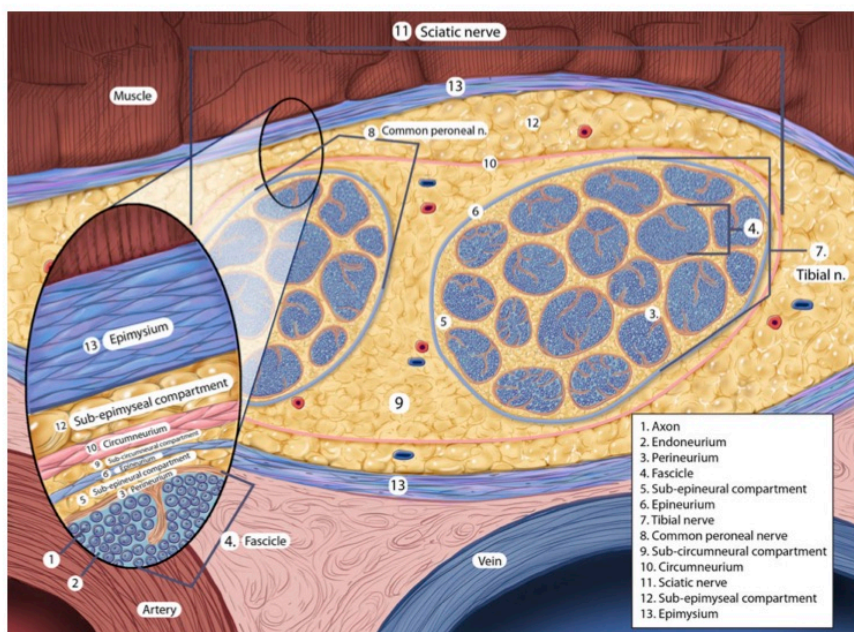


Fig. 1. Schematic drawing of the sciatic nerve. The axons are myelinated or unmyelinated and in the endoneurium. The axons and endoneurium are surrounded by the perineurium to form a fascicle. A bundle of fascicles is, in turn, surrounded by an epineurium, which forms a nerve – the tibial nerve (T) and the common peroneal (fibular) nerve (C) in this case. Both these nerves are bundled together by a circumneurium (formerly called the paraneurium) to form the sciatic nerve approaching the popliteal fossa (PSN). The fascia in which the nerves, arteries, and muscles are housed is the epimysium. Each of these layers has a compartment deep to it: the subepimyseal, the subcircumneurial, subepineurial, and the subperineurial compartments. The latter is referred to as intrafascicular, while the subepineurial space is interfascicular. All the compartments except the intrafascicular (subperineurial) contain adipose tissue. (Figure 1 placed with the kind permission of Mary K. Bryson, who holds the copyrights). [Color figure can be viewed at wileyonlinelibrary.com]

phase. The second and third phases depend on the concentration gradient across the neural membranes and their permeability (Fick's First Law of Diffusion). In considering the importance of onset times of different LAs, the different anesthetic nerve blocks used in everyday clinical practice, their density and their duration of action, we first need to identify the location where the LA is injected. These anatomical spaces or compartments have to be studied without cross-contamination with neighboring compartments, and the findings subsequently correlated with clinical methods such as ultrasound and nerve stimulation.

To improve our understanding of these membranes, barriers, and compartments into which a LA is deposited (phase 1) and through which it has to diffuse (phases 2 and 3), we first had to identify a histological marker that is readily available, recognizable under light microscopy, and contains particles of uniform shape and size that do not distort the tissue in the nerve compartments into which it has been injected or the membranes surrounding them. Most importantly, it should remain inside the compartment into which it has been deposited without extravasation or diffusion into neighboring compartments. Finally, when slides are prepared for histological examination, the ideal marker should not be distorted by the microtome blades or harm them. Markers that have been used (commonly, methylene blue and India ink) in anatomical studies have multiple drawbacks including extravasation into non-injected locations owing to its small and heterogeneous molecular sizes. To the best of our knowledge, methylene blue is eliminated or neutralized by most coloring techniques and is therefore not suitable for microscopic study of peripheral nerve compartments. This impairs our understanding by making reproducible research into nerve compartments difficult and could cause confusion.

Therefore, we examined a novel new marker, heparinized blood solution (HBS), which we believe has the foregoing attributes. The aim of this study was to evaluate HBS as a marker.

METHODS

The study was approved by Grupo Hospital Madrid Clinical Research Ethics Committee (CEIC code 16.03.0922-GHM). Blood samples were collected in the operating room from 22 patients who provided informed consent, were free of infectious or hematological disease, had a hematocrit between 32% and 40%, and were treated for atrial fibrillation. Sampling took place during atrial electrical pathway ablation when anticoagulation adequate for the procedure was achieved through continuous administration of intravenous heparin. A total of 50 mL of blood was obtained from each patient and stored for 1–2 days at 5 °C after the addition of 25,000 IU of heparin, which increased the sample volume to 75 mL. The samples of blood from different patients were not mixed. Each sample of blood was treated in isolation to the others. We called the final mixture of blood, heparin, and saline "HBS" and the solutions collected from the 22 patients were used for the 32 simulated nerve blocks, never mixing the samples for one particular "block." The

22 samples were approximately 75 mL each and we only used 5–10 mL per "block," so the rest could be discarded.

In the Department of Anatomy (CEU San Pablo University School of Medicine), we simulated four common nerve blocks (infraclavicular brachial plexus cords, axillary, median at the elbow, and sciatic nerves) in four fresh cadavers using HBS instead of LA or traditional markers. This was done under ultrasound guidance as in routine clinical practice for ultrasound-guided anesthetic nerve blocks by injecting HBS to form a so-called "doughnut" by "hydrodissecting"⁵ with the HBS. We used 22-gauge 15° angle ("D") StimuPlex D Needles (B. Braun, B. Braun, Melsungen, Hesen Germany). The antero-posterior measurement of this needle was 1.8 mm, and it was placed in plane after identifying the target nerve. The HBS was then fractionally injected to identify the correct position of the needle by observing the formation of the above-mentioned "doughnut" sign. This "doughnut" formed by hydrodissection seen on ultrasound is commonly believed among anesthesiologists to open the space between the epimysium and the circumneurium (formerly the paraneurium), which is considered the optimal space for LA delivery for single-injection anesthetic nerve blocks.

The four cadavers were obtained from the Body Donation Program of the Department of Human Anatomy of the School of Medicine. Upon arrival, they were kept in a refrigerator at 4 °C while their blood was analyzed for the presence of any infectious diseases. They were then frozen at –20°C within 36 hrs upon arrival for 5–7 days. After that, before they were used, they were left at 4 °C for 48 hours and then for 6–8 hrs at less than 22 °C. No preservation agents were used.

Intraneural injection (deep to the epineurium) was avoided as far as possible given the standard ultrasound equipment used, which does not provide high definition. Ten milliliters was injected for simulated sciatic, brachial plexus cord, and axillary nerve blocks, and 5 mL for the simulated median nerve blocks at the elbow. Anesthesiologists experienced in ultrasound-guided nerve blocks performed all four simulated nerve blocks on each of the four cadavers bilaterally, giving a total of 32 "nerve blocks."

The segments were then dissected in blocks containing the nerves, surrounding tissue, and neighboring blood vessels, which were fixed in 10% buffered formaldehyde for 7 days. Thereafter, the segments were cut perpendicular to the long axis of the plexuses and nerves into tissue slices 5–6 mm thick. The slices were immersed in 10% buffered formaldehyde for an additional 10 days. Histological sections were prepared for light microscopy by processing them with paraffin wax and serially sectioning them into 3 µm slices with a microtome. These were stained with hematoxylin and eosin under standard conditions and then examined under a scanning microscope (Leica SCN400 Slide Scanner, Meyer Instruments, Inc., Houston, TX, USA). Transmembrane movement of HBS to the various tissue compartments and clot formation due to erythrocyte aggregation were analyzed. The slides were studied for possible extravasation from compartments.

4 Reina et al.

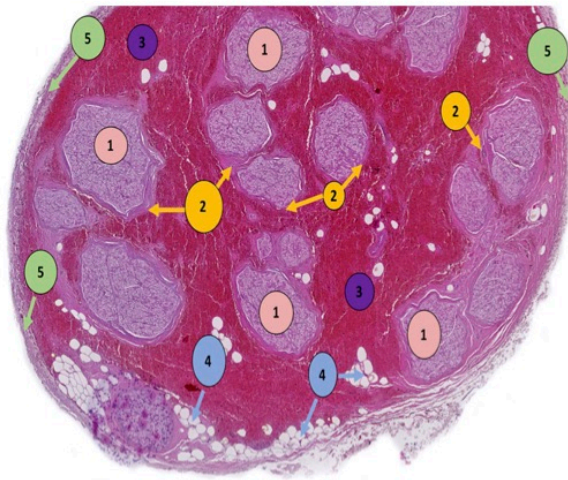


Fig. 2. Interfascicular (subepineural) spread deep to the epineurium but outside the various perineuria of the fascicles (magnification $\times 40$). 1 = fascicle; 2 = perineurium; 3 = heparinized blood solution marker; 4 = adipocytes; 5 = epineurium. [Color figure can be viewed at wileyonlinelibrary.com]

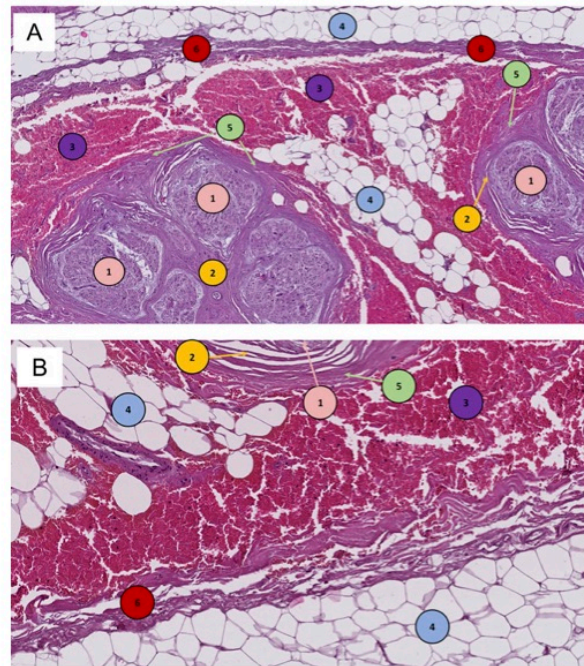


Fig. 4. A and B, Spread in popliteal sciatic nerve between circumneural sheath (6) and epineurium (5). A, magnification $\times 120$. B, magnification $\times 220$. 1 = fascicle; 2 = perineurium; 3 = heparinized blood solution marker; 4 = adipocytes; 5 = epineurium; 6 = circumneural sheath. [Color figure can be viewed at wileyonlinelibrary.com]

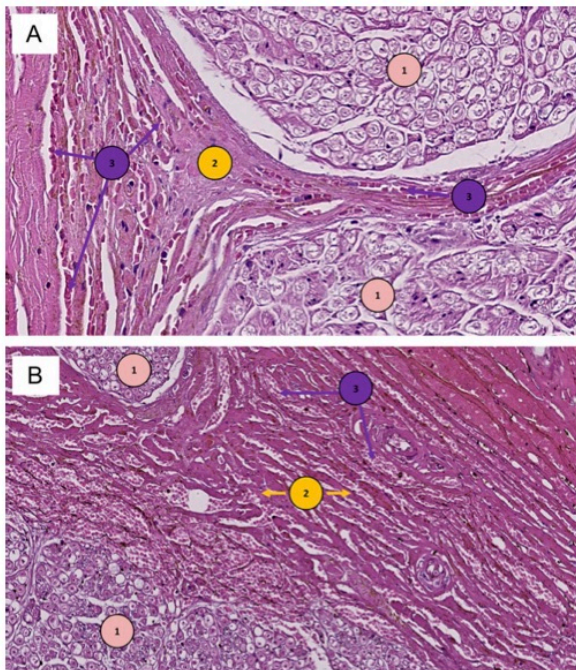


Fig. 3. A and B, Spread between layers of perineurium. A, magnification $\times 340$. B, magnification $\times 700$. 1 = fascicle; 2 = perineurium; 3 = heparinized blood solution marker. [Color figure can be viewed at wileyonlinelibrary.com]

RESULTS

Although we assumed that injection into the "doughnut" formed by "hydrodissection" would be limited to the subepimyseal compartment, HBS was found in all the nerve compartments except the fascicles. This was due to direct delivery into the compartments in question despite our best efforts to avoid intraneural injection. There was some spillage from the puncture hole made by the needle, but the HBS nevertheless remained mainly inside the compartment into which we believe it had been deposited. When the ultrasound pictures were re-examined, it was clear that the "doughnut", which we thought represented subepimyseal injection, could actually form after injection into any nerve compartment, so the HBS marker was found in all nerve compartments except within the endoneurium of the fascicles (Fig. 2). However, it was found between the cell layers of the perineurium (Fig. 3). No adipose tissue was found inside the fascicles or between the cell layers of the perineuria. The circumneural sheath (formerly the paraneurium) (Fig. 4) and epineurium (Fig. 4) limited the passage or extravasation of the HBS particles. Groups of adipocytes were separated by the injected HBS (Fig. 5) and HBS cells could be seen between

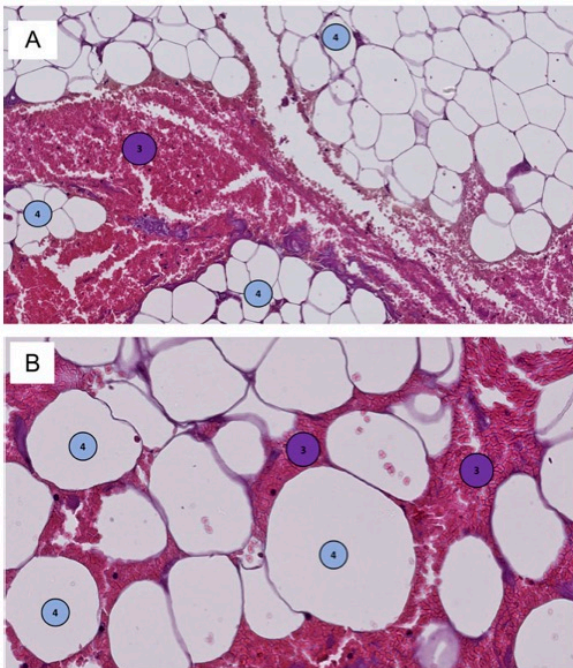


Fig. 5. A and B, Adipose tissue pushed apart without changing shape. A, magnification = 400. B, magnification = 800. 3 = heparinized blood solution marker; 4 = adipocytes. [Color figure can be viewed at wileyonlinelibrary.com]

them (Fig. 5). The adipocytes were not compressed or deformed by the injected HBS.

Artifacts were easily identified. They were translucent and clearly did not belong in a specific compartment. It was not possible to show the exact points where a

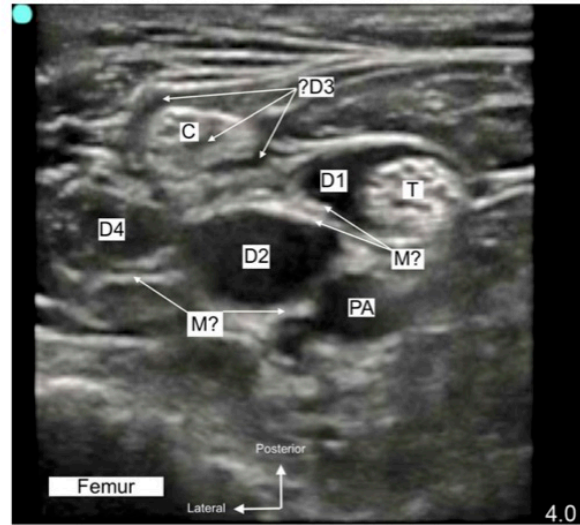


Fig. 7. Sonogram of a popliteal sciatic nerve from this study. Numerous fluid-filled "doughnuts" are formed (D1, D2, D3, and D4). The tibial nerve component of the popliteal sciatic nerve is marked as T and C is its common peroneal (fibular) component. The various membranes marked as M? cannot be identified with the ultrasound used for this study. PA is the popliteal artery. [Color figure can be viewed at wileyonlinelibrary.com]

membrane had been penetrated on the two-dimensional histological slides. In any case, demonstrating the exact points of injection was not the objective of this study.

There was no intramuscular spread from extra-neural subepimyseal injection, probably because the epimyseal layer formed an effective barrier (Fig. 6).

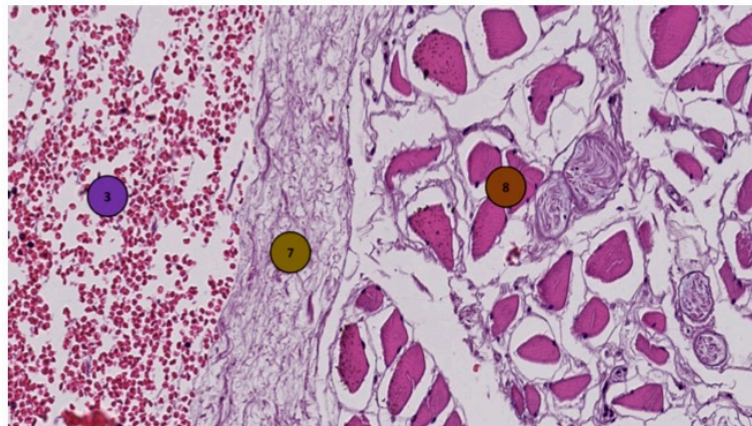


Fig. 6. No intramuscular spread due to epimysium (magnification $\times 480$). 3 = heparinized blood solution marker; 7 = epimysium; 8 = muscle fibers. [Color figure can be viewed at wileyonlinelibrary.com]

6 Reina et al.

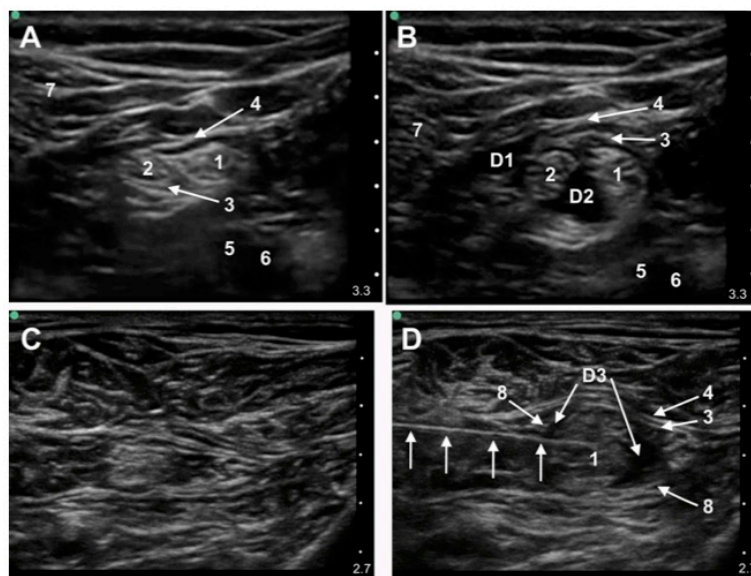


Fig. 8. Sonogram that illustrate the numerous fluid-filled spaces (D1, D2, and D3) and the needle (arrows) clearly being placed intraneurally, which we tried to avoid in this study. (A) Popliteal sciatic nerve before injection of HBS. (B) Popliteal sciatic nerve after injection of HBS. (C) Tibial nerve before needle placement and HBS injection. (D) Tibial after needle placement (intraneural accidentally) and HBS injection. 1 = Tibial nerve. 2 = Common peroneal (fibular) nerve. 3 = Presumably the epineurium*. 4 = Presumably the circumneurium*. 5 = Popliteal vein. 6 = Popliteal artery. 7 = Presumably circumneurium layer*. 8 = Presumably circumneurium layer*. *Can only be confirm with high-definition ultrasound. [Color figure can be viewed at wileyonlinelibrary.com]

The stained erythrocytes in the HBS served as a particulate marker of uniform size, approximately 6–7 μm in diameter.

The shape and size of the membranes or barriers formed by the collagen fibers of the epimyseal, circumneurial, epineurial, and perineurium layers remained unchanged and were not distorted. These layers were sufficient to retain the erythrocytes within each compartment, although the compartments appeared to increase in circumference. However, this could not be confirmed because we had no pre-injection measurements for comparison.

Finally, the erythrocytes in the HBS did not form a thrombus or obstruct the visibility of structures deep to them in any of the samples examined. The erythrocytes were identifiable throughout, as were areas where tissue compartments had apparently become enlarged after injection.

DISCUSSION

We describe the use of heparinized erythrocytes from HBS as an alternative to India ink, methylene blue, or other dyes as a marker for locating solutions during simulated ultrasound-guided peripheral nerve blocks in fresh cadavers. There was no extravasation of the injected HBS into or out of the compartment

into which it had been deposited. However, in some samples, there appeared to have been back-leakage where the membranes had been damaged by the injecting needle.

We erroneously assumed that the injection that formed a “doughnut” would be into the subepimyseal compartment. However, re-examination of the ultrasound images (Figs. 7 and 8) and the high-definition images of Karmakar (2015) revealed that the various membranes cannot be identified with the regular ultrasound we used, and injection into most compartments was likely to form such a “doughnut” (Figs. 7 and 8). What we thought were extraneural injections (between the epimysium and the circumneurium) were therefore not, and most of our attempted extraneural injections were in fact intraneural. Krediet et al. (2014) found that one in six ultrasound-guided nerve blocks performed by physicians experienced in ultrasound-guided nerve blocks were actually intraneural despite attempts to avoid this. In our study, this number, however, must have been much higher, even approaching 100%. We speculate that if the Krediet group, who studied live patients, had had the opportunity to examine the nerves histologically after their injections, their incidence of intraneural injection would perhaps have been closer to ours.

Anticoagulated blood collected from patients was used instead of banked blood because the integrity of stored red blood cells requires further research; expired banked blood would be easier to obtain. The HBS from different samples never came into contact with each other — neither before nor during the performance of a “block.” This and the fact that we visually inspected the HBS cells under a microscope ruled out the possibility of any destruction to the cells caused by antigen–antibody reactions. Light microscopy of the slices containing the nerve and neighboring tissue revealed the compartment into which the solution had been injected. Intraneural injection deep to the epineurium was apparent in most instances, but it was accidental not intentional.

A number of concentric compartments containing fat cells were identified around the nerve fascicles (Fig. 1). The number and shape of these compartments varied according to the nerves examined and their locations. The doughnut-shaped image produced on ultrasound with a specific technique could therefore differ depending on the position of the needle tip and the type of nerve. This marker enabled us to study the exact locations of the different membranes surrounding the nerves and the compartments they formed. Although we found no HBS in the endoneuria of the fascicles, we could see erythrocytes between the layers of the perineurium, nor did we find any adipocytes inside any of the fascicles. Orebaugh and coworkers probably found the same, although their image that suggested it intrafascicular spread, was of relatively low magnification and was not wholly clear (Orebaugh et al., 2010). Also, they did not study peripheral nerves but central spinal nerve roots and trunks, which could be different.

One limitation of the study was that the HBS was injected under ultrasound guidance not direct vision. The authors therefore assumed that the injection was into the subepimyseal compartment between the epimysium and circumneurium — as anesthesiologists generally assume when they observe the formation of a “doughnut” sign — which was clearly not the case. In future studies, researchers could elect to inject the marker under direct vision into specific nerve compartments. This will most probably remove all questions about possible postmortem tissue degradation and diffusion. A further limitation was that HBS does not resemble LA in molecular size, so its diffusion properties must differ. However, the purpose of the study was not to examine LA spread and final diffusion but to evaluate a marker that could better reveal the complexities of the nerve membranes and help us better study the microscopic architecture of nerve membranes. Finally, back-leakage during indirect (ultrasound-guided) injection could have been problematic, and further studies to clarify the term “intraneural injection” are warranted. The technology with this marker would probably make such studies more feasible, but further research is warranted to clarify this. Finally, it could be argued that the HBS was in fact injected extraneurally as intended and that it leaked into the nerves because the membranes had undergone postmortem changes. However, if this

were the case, it cannot explain why the leakage through the membranes into the nerves was unidirectional and not out of the nerve compartments as well as clearly seen in Figures 4 and 6. Not only did the HBS not leak into the compartment, it also did not leak out of the compartments. Postmortem changes, if present, would permit leakage of the cells in both directions. The only possible explanation is that the HBS was inadvertently deposited inside the nerves and then, apart for the small amounts that leaked back through the needle puncture holes, remained inside the compartment into which it had been injected.

CONCLUSIONS

HBS is readily available and compatible with most histological techniques. Its particles are uniform and predictable in size and shape, and it is easily identified by light microscopy. This technique enabled us to study the longitudinal and circumferential spread in all nerve compartments and to collect data for better interpretation of factors influencing an anesthetic nerve block and situations in which complications could possibly arise. HBS seemed superior to other markers because it did not leave the compartments into which it had been injected, did not distort the tissue, and was easily visible under the light microscope. Future studies will enable us to use this technique to specifically study deliberate intraneural injection as well as to correlate the histological findings with the images seen on ultrasound.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors sincerely thank Corey Astrom, ELS, of the University of Florida (Gainesville, FL) for her help with the preparation of this manuscript. The authors thank Javier Moratinos-Delgado Tch, Virginia García-García Tch, and Paloma Fernández, BS, PhD, of the CEU San Pablo University School of Medicine (Madrid, Spain), for their assistance in creating the images. The authors also thank the cadaveric donors. This work was accomplished in the Surgery and Morphological Sciences Doctorate framework of Universitat Autònoma de Barcelona.

DISCLOSURES

Miguel A. Reina, MD, PhD: This author helped design the study, conduct the study, collect the data, analyze the data, and prepare the manuscript. This author is also the archival author.

André P. Boezaart, MD, PhD: This author helped design the study, conduct the study, collect the data, analyze the data, and prepare the manuscript.

Xavier Sala-Blanch, MD: This author helped design the study, conduct the study, collect the data, and prepare the manuscript.

Enrique Monzó, MD, PhD: This author helped conduct the study, collect the data and prepare the manuscript.

8 Reina et al.

R. Shane Tubbs, PhD: This author helped conduct the study, collect the data and prepare the manuscript.

Anna Server, MD: This author helped conduct the study, collect the data and prepare the manuscript.

Paul Bigeleisen, MD: This author helped design the study, conduct the study, collect the data, analyze the data, and prepare the manuscript.

REFERENCES

- Anderson HL, Anderson SL, Tranun-Jensen J. 2012. Injecting inside the paraneural sheath or the sciatic nerve: direct comparison among ultrasound imaging, macroscopic anatomy and histologic analysis. *Reg Anesth Pain Med* 37:410–414.
- Karmakar MK. 2015. High-definition and three-dimensional volumetric ultrasound imaging of the sciatic nerve. In: Reina MA, editor. *Atlas of Functional Anatomy for Regional Anesthesia and Pain Medicine*. New York: Springer. p 355–383.
- Karmakar MK, Shariat AN, Pangthipumpai P, Chen J. 2013. High-definition ultrasound imaging defines the paraneural sheath and the fascial compartments surrounding the sciatic nerve at the popliteal fossa. *Reg Anesth Pain Med* 38:447–451.
- Krediet AC, Moayeri N, Bleys RLA, Groen GJ. 2014. Intraneural or extraneural: Diagnostic accuracy of ultrasound assessment of localizing low-volume injection. *Reg Anesth Pain Med* 39:409–413.
- Orebaugh SL, McFadden K, Skorupan H, Bigeleisen PE. 2010. Subepineurial injection in ultrasound-guided interscalene needle tip placement. *Reg Anesth Pain Med* 35:450–454.
- Reina MA, Sala-Blanch X. 2015. Cross-sectional microscopic anatomy of the brachial plexus and paraneural sheaths. In: Reina MA, editor. *Atlas of Functional Anatomy for Regional Anesthesia and Pain Medicine*. New York: Springer. p 161–188.
- Reina MA, Dominquez MF, Tardieu I. 2015. Origin of the fascicles and intraneural plexus. In: Reina MA, editor. *Atlas of Functional Anatomy for Regional Anesthesia and Pain Medicine*. New York: Springer. p 99–126.

6.3 Altres publicacions originals.

-Reina MA, Machés F, Vicente-Montaña A, Server A, García V, Moratinos J, Fernández P. Clinical anatomy for regional anesthesia from peripheral nerve to spinal cord revisited. *Reg Anesth Pain Med* 2018;43(S1):e38-e40.

Resum Ponència presentada en el 37th Annual ESRA Congress. September 12-15, 2018 Dublin (European Society of Regional Anaesthesia), publicada com número suplement en el *Regional Anesthesia Pain Medicine*.

Revista: *Regional Anesthesia Pain Medicine*
Factor d'impacte (Journal Citation Report - JCR (2017)): 4.382
Ordre d'autor: Quart de set
Categoria en JCR: Anesthesiology
Ordre en l'especialitat: 5 de 31 revistes
Categoria en quartils: Primer quartil (Q1)
Editorial: Lippincott Williams & Wilkins,
Two Commerce SQ, 2001 Market ST, Philadelphia, PA 19103 EEUU
ISSN: 1098-7339
eISSN: 1532-8651

-Reina MA, Boezaart AP, Sala-Blanch X, Monzó E, Server A, Bigeleisen P. What's new in intraneural injections? Basic research. *Reg Anesth Pain Med* 2018;43(S1):e1-e2.

Resum Ponència presentada en el 37th Annual ESRA Congress. September 12-15, 2018 Dublin (European Society of Regional Anaesthesia), publicada com número suplement en el *Regional Anesthesia Pain Medicine*

Revista: *Regional Anesthesia Pain Medicine*
Factor d'impacte (Journal Citation Report - JCR (2017)): 4.382
Ordre d'autor: Cinquè de sis
Categoria en JCR: Anesthesiology
Ordre en l'especialitat: 5 de 31 revistes
Categoria en quartils: Primer quartil (Q1)
Editorial: Lippincott Williams & Wilkins,
Two Commerce SQ, 2001 Market ST, Philadelphia, PA 19103 EEUU
ISSN: 1098-7339
eISSN: 1532-8651

DISCUSSIÓ

*“Lo más difícil es tomar la decisión de actuar,
lo demás es pura tenacidad”*

Amelia Earhart

7. DISCUSSIÓ.

A partir dels resultats obtinguts en aquesta Tesi, s'ha demostrat que l'arquitectura microanatòmica del nervi ciàtic de 6 espècies de mamífers, inclosa la humana, difereix en les variables estudiades. A més, s'ha demostrat la utilitat de la solució de sang heparinitzada com marcador d'injeccions intraneurals.

Variacions macroanatòmiques evidents entre les grans i petites espècies en les variables relatives a la secció transversal i circumferència del nervi eren esperables degut a la diferència de mides corporals i d'extremitats entre els mamífers estudiats. No obstant, la intenció de l'estudi va ser demostrar si també es presentaven diferències en relació amb la microanatomia de cadascun dels nervis estudiats.

Per poder portar a terme la verificació de la hipòtesi, a part d'estudiar els nervis de forma parcial a partir dels camps de visió que poden aportar els microscopis d'alt augment, també es van analitzar els talls complets dels nervis a alta magnificació amb microscopis d'alta resolució, permetent la suma integrada de tots els camps de visió del tall complet del teixit.

A partir d'aquests resultats es van obtenir grans diferències en la majoria de variables analitzades, però especialment en la relació FA:TNA, la qual representa la fracció de teixit no neural, i a la qual se li atribueix una funció protectora dels fascicles^{88,154,155}.

Les diferències microanatòmiques podrien qüestionar l'ús realitzat fins ara en diferents models animals per a diferents tipus d'estudis amb la pretensió d'extrapolar aquests resultats a l'humà i a partir d'aquí generar recomanacions en la pràctica clínica.

Diversos tipus d'investigacions mereixen la seva anàlisi; malgrat que en el nostre estudi només es van analitzar diferències morfològiques, hem de tenir en compte que aquestes diferències també afectaran a aspectes bioquímics, fisiològics, farmacològics i toxicològics. Aquestes diversitats entre els models animals i l'humà invaliden l'aplicació de les conclusions obtingudes.

Discussió

Aquesta seria una explicació plausible del fet que estudis preclínic exitosos en certes espècies animals no presentin una correcta correlació amb la cirurgia regeneradora dels nervis perifèrics i l'evolució clínica en l'humà¹⁵⁶.

Considerant els nostres resultats, no sembla massa probable que el mateix estudi experimental reproduït de manera fidedigna en cadascuna de les espècies descrites pugui proporcionar els mateixos resultats.

Cal fer esment que a part de les diferències microanatòmiques, molt probablement puguin existir diferències en altres propietats dels nervis tal com la permeabilitat de les membranes, fent encara més qüestionable l'extrapolació directa a l'humà de dites conclusions sense incórrer en imprecisions. No obstant, aquest tipus d'estudis no han pogut ser considerats com objectius del nostre estudi per la seva heterogeneïtat.

Les lesions nervioses perifèriques associades a la pràctica de bloquejos anestèsics i injeccions intraneurals suposen una patologia poc freqüent però en l'actualitat no es disposa d'una incidència real ja que la bibliografia existent es limita a estudis observacionals. A més a més, el fet de no disposar d'una homogeneïtat en els criteris d'identificació de la lesió nerviosa dificulta encara més poder disposar de l'escenari actual¹⁵⁷. Afortunadament, la majoria de lesions nervioses relacionades amb la pràctica prèvia d'una tècnica d'anestèsia regional es presenten en forma d'alteració sensitiva i no motora, no augmenten el temps de recuperació del pacient i són autolimitades; tanmateix, cal destacar que un 0,01-0,04% pot acabar presentant una afectació nerviosa permanent¹⁵⁸⁻¹⁶¹. Tot i representar una incidència força baixa, considerant la important repercussió que pot comportar pel pacient, pel propi metge i per la societat, és necessari seguir investigant per millorar la prevenció, el diagnòstic precoç i el tractament de les mateixes.

Fins a l'actualitat, sempre s'ha considerat que les injeccions intraneurals anaven indiscutiblement associades a lesió nerviosa, motiu pel que sempre es recomanava tenir especial cura en posicionar la punta de l'agulla en el teixit extraneural (compartiment gras extraneural)¹⁶². No obstant això, estudis recents van començar a qüestionar aquesta teoria en demostrar que certes injeccions a nivell intraneural no només eren segures i no ocasionaven seqüeles nervioses sinó que a més a més, podrien ser desitjables en certs casos per assegurar un bloqueig nerviós

complet^{1,163-166}. La majoria d'aquests estudis van ser notificacions de puncions intraneurals accidentals però en alguns casos també deliberades, iniciant d'aquesta manera el debat sobre si les injeccions intraneurals eren realment tant lesives.

La denominació ben delimitada dels diferents compartiments del nervi en “fora i dins” del nervi i les possibles localitzacions de la punta de l'agulla respecte el nervi, plantegen tot un ventall de possibilitats i ha motivat que alguns investigadors aprofundissin en el complex estudi de les lesions intraneurals. El tema és més complex del que podria semblar, atès que l'ús durant tots aquests anys d'una terminologia poc clara i en certes ocasions no apropiada per resultar ambivalent, ha afegit més confusió al tema.

Per aquest motiu, va ser necessari aprofundir en el coneixement intern del nervi i dels teixits que l'envolten per poder esclarir conceptes tan bàsics com el límit del nervi en casos tan complexes com el nervi ciàtic. Aquests límits són més fàcilment identificables en nervis simples com el nervi medià, nervi cubital o nervi radial i, per aquesta raó, motiva un estudi individualitzat de cada nervi. Aquest fet ha suscitat parlar d'injeccions intraneurals en el nervi ciàtic quan, de fet, en realitat es tracten de tècniques extraneurals. L'explicació radica en que des d'un punt de vista macroscòpic, el nervi ciàtic és un nervi que manté la seva individualitat, però des d'una visió microscòpica, el nervi ciàtic no és una entitat pròpia sinó la suma de dos nervis, el tibial i el peroneo comú ja des del seu origen. Aquest és el motiu pel que la divisió macroscòpica en les dues branques pugui ocórrer en qualsevol punt del trajecte, malgrat el més freqüent sigui en la regió poplítia. El nervi ciàtic presenta un compartiment gras limitat per una membrana de circumneuri que envolta els dos nervis en el seu interior, sent aquesta una de les confusions habituals, tenint en compte que durant dècades es va confondre aquesta membrana amb l'epineurium. Una injecció dins d'aquest compartiment gras s'ha considerat fins ara una injecció intraneural quan de fet la injecció es produeix fora d'ambdós nervis. A diferència del nervi ciàtic, una proposta d'injectar l'anestèsic de la mateixa manera en nervis com el medià, el radial o el cubital, sí que resultaria en injeccions intraneurals.

Discussió

L'anàlisi específica del nervi ciàtic té una especial importància atès que la majoria dels estudis realitzats sobre espècies animals sempre s'han portat a terme en nervi ciàtic.

En l'àmbit experimental preclínic, tant Hadzic como Kapur van demostrar en gossos que les injeccions intraneurals i intrafasciculars s'associaven amb altes pressions d'administració i causaven lesions fasciculars amb alteracions clíniques neurològiques, mentre que les injeccions subepineurals però extrafasciculars s'associaven amb pressions més baixes i no presentaven clínica neurològica^{144,153}. El fet diferencial entre una circumstància i l'altra rau en la diferent compliància de cadascun dels compartiments. És àmpliament acceptat que el perineuri (format per cèl·lules unides entre elles) que envolta el compartiment intrafascicular (fascicles) no es distén degut a les fortes unions cel·lulars, les cèl·lules no s'allarguen i, per tant, augmenta la pressió que es genera dins del fascicle fins un punt màxim en que es trencarien les cèl·lules perineurals (el perineuri) produint la lesió fascicular.

Paral·lelament, Whitlock va realitzar els seus estudis en el camp histològic i va demostrar que injeccions intrafasciculars de ropivacaïna al 0,75% en rates presentaven més lesió histològica que les injeccions extrafasciculars¹⁶⁷. Possiblement l'efecte neurotòxic directe de l'anestèsic local sobre els axons podria ser el responsable.

En els nervis de totes les espècies animals mamíferes existeix l'endoneuri, el perineuri i l'epineuri, però en l'àmbit histològic i bioquímic, no s'ha pogut demostrar que les característiques microanatòmiques de les diferents capes en cadascuna de les espècies siguin exactament iguals. Des d'un punt de vista microanatòmic, les variables de número, radi i circumferència de fascicles, organització de grups fasciculars o relació de teixit neural i no neural és clarament diferent. Per aquest motiu, considerem que l'extrapolació directa a l'humà de resultats sobre l'origen i resolució de lesions nervioses estudiades sobre nervis ciàtics animals s'ha de realitzar amb precaució. Encara podria ser més negatiu realitzar aquestes extrapolacions del nervi ciàtic a tots els nervis humans, donades les marcades diferències a nivell intern entre els nervis.

La relació FA:TNA tindria especial rellevància en la valoració de l'efecte iatrogènic de les agulles utilitzades en la realització dels bloquejos d'anestèsia regional. Podria tenir un valor determinant degut a que a major component de teixit no neural (adipós), menor vulnerabilitat a patir una lesió neural (axonal). Diversos estudis han demostrat la diferent incidència de lesió nerviosa depenent de la zona del trajecte nerviós que utilitzem; les arrels seran més susceptibles de lesió nerviosa degut a que presenten un alt percentatge d'àrea fascicular, com es demostra en estudis que situen la incidència en el bloqueig interescaletànic en un 3% mentre que, a nivell més distal, el bloqueig supraclavicular només presenta un 0,03%^{168,169}. Per aquest motiu, el fet d'escollir nervis d'espècies animals que no presentin una relació FA:TNA comparable a la del nervi humà, pot comportar resultats erronis.

A part de la microanatomia del nervi, la mida de l'agulla (tant diàmetre extern com intern) en relació amb el nervi també té un rol determinant⁸⁸. Resulta força obvi tenir en compte que si utilitzem igual calibre d'agulla en diferents espècies animals sense considerar la mida del nervi en qüestió, els resultats poden arribar a ser molt divergents i poc comparables entre ells (veure annex).

Un altre tema a valorar és l'elecció de l'espècie animal que reproduïx de la manera més acurada possible l'escenari que es pretén estudiar per poder extrapolar els resultats. Sobretot en el tema de les lesions nervioses associades a l'anestèsia regional i, en particular, en l'estudi de les lesions intraneurals, no sempre s'ha utilitzat el model experimental més apropiat. Entre els múltiples factors destacaria el fet que la majoria de grups investigadors estan limitats en l'accés a les espècies experimentals; estan supeditats als recursos disponibles del laboratori i no poden escollir l'espècie animal apropiada sinó que utilitzen les de més fàcil accés. És per aquest motiu que existeix un condicionament inicial que en molts casos és inevitable i, justament per això, seria important utilitzar agulles proporcionals a la mida del nervi per no afegir més biaixos. Sobretot en l'estudi de les lesions intra o extrafasciculars escollir l'agulla proporcional al nervi és fonamental per poder millorar la correlació entre les troballes i la pràctica clínica humana. Cal esmentar que el sol fet del contacte entre agulla i nervi ja produeix una resposta inflamatòria amb una sèrie de canvis a nivell cel·lular de la neurona

Discussió

amb expressió alterada dels canals de membrana o de neuropèptids^{170,171}; de la mateixa manera, pel propi mecanisme traumàtic de l'agulla travessant la beina perineural, es pot produir lesió o herniació fascicular¹⁷². Kirchmair va realitzar un estudi en model porcí avaluant els potencials d'acció muscular durant l'avançament d'una agulla i va demostrar que es produïa un descens en l'amplitud del potencial d'acció que indicava un bloqueig de conducció i una alteració funcional; en injectar sèrum salí de manera continuada empitjorava el bloqueig de la conducció i el *swelling* evidenciat per ecografia¹⁷³.

Referent a la configuració del disseny del bisell de l'agulla, es van realitzar estudis amb bisell curt (30-45°) i bisell llarg (12°) per demostrar la probabilitat de lesió fascicular i també es va demostrar que l'orientació del propi bisell podria tenir un paper important en la possibilitat de lesió nerviosa¹⁷⁴. Selander va observar en el nervi ciàtic del conill que els bisells curts, pel fet de ser menys afilats, desplaçaven els fascicles i, per tant, es lesionaven menys¹⁰ i aquest fet també es va confirmar en estudis amb cadàvers humans¹⁷⁵. Paradoxalment, Rice va basar els seus estudis en el nervi ciàtic de rata i com a conseqüència dels seus resultats histològics i clínics va demostrar el contrari que Selander, és a dir, que els bisells curts produïen lesions amb una major incidència, i que a sobre les lesions eren més greus i perduraven més en el temps (28 dies d'avaluació) que els bisells llargs⁹. Ambdues troballes, aparentment contradictòries entre Selander i Rice, podrien ser correctes degut a que metodològicament eren diferents, tant en l'espècie animal escollida com en el tipus d'agulla utilitzada.

En relació als estudis de toxicitat, l'efecte citotòxic dels AL és proporcional a diversos factors: tipus, concentració i duració d'efecte del fàrmac i lloc exacte del dipòsit del fàrmac¹⁷⁶. En el nostre estudi, l'ús d'un nou marcador ens ha permès identificar diferents alternatives en la distribució de la solució injectada tant dins com fora del nervi. Ha quedat palès en els nostres resultats la gran dificultat i quasi impossibilitat de realitzar injeccions dins dels fascicles humans i d'alguns animals, inclús quan la intenció era precisament aquesta i s'utilitzaren grans volums per sobre dels utilitzats en la pràctica clínica habitual per intentar reproduir les condicions més adverses.

Fins ara sempre s'ha responsabilitzat la injecció intraneural de greus complicacions neurològiques i s'ha assumit que la injecció intrafascicular es produïa paral·lelament a la injecció intraneural. Els nostres resultats s'oposen a aquestes idees clàssiques i mantingudes durant dècades. En canvi, sí que compartim l'opinió que la millor condició per aconseguir un efecte tòxic és introduir la solució dins del fascicle en contacte directe entre els axons i l'endoneuri, però és necessari valorar altres aspectes que puguin justificar les lesions, ja que l'opció de la injecció intrafascicular és poc freqüent.

Cal tenir en compte que l'efecte tòxic d'un fàrmac injectat a nivell extraneural, ja evidencia canvis histològics en el compartiment extraneural i aquests canvis augmenten si el dipòsit del fàrmac ha tingut lloc en una localització més interna cap als fascicles. El tipus d'anestèsic local també està més relacionat amb el grau de lesió histològica, sent la bupivacaïna la que presenta toxicitat a baixes concentracions per les cèl·lules de Schwann en estudis amb rates¹⁷⁶. Els mecanismes tòxics dels AL són molt variats i, malgrat que es desconeixen els fenòmens exactes implicats, es produeixen alteracions diverses a nivell de senyalització neuronal, de la concentració de calci intracel·lular, de la fosforilació oxidativa, de la producció de radicals lliures d'oxigen o inclús inducció d'apoptosi^{51,171}. També és important recordar el mecanisme de lesió isquèmica associada als AL per l'efecte que provoca a nivell de la membrana perineural, amb alteració de la permeabilitat i desenvolupament d'edema intrafascicular i augment de la pressió del fluid endoneural dins de les fibres nervioses¹⁷⁷; no obstant això, cal mencionar que el nervi perifèric presenta una alta tolerància als efectes isquèmics, motiu pel que aquest fet no sembla ser un factor molt contribuent¹⁵⁷. En el moment actual no disposem d'estudis comparatius entre diferents espècies animals que avaluïn la diferent sensibilitat i llindars de canvi davant l'efecte tòxic dels AL a diferent concentració per dins o fora del nervi. Havent valorat els resultats del nostre estudi, és lògic esperar que la resposta no sigui igual en totes les espècies.

En el camp de l'estudi de la toxicitat nerviosa en el nervi perifèric, novament és essencial considerar l'àrea, circumferència i radis dels fascicles per poder valorar l'efecte tòxic dels AL, atès que d'aquestes diferents mesures depenen els processos

Discussió

de difusió per aconseguir arribar de forma parcial o total als axons d'un fascicle que pot ser afectat en envoltar-se d'una solució tòxica. Per tant, tal i com s'ha demostrat en el nostre estudi, considerant que les espècies animals estudiades (que es corresponen amb algunes de les més utilitzades en el camp experimental) són heterogènies entre elles, considerem que els resultats i conclusions podrien no ser vàlids per a l'espècie humana o, com a mínim, no vàlids en la seva totalitat.

La literatura disponible referent a l'experimentació animal en lesió nerviosa presenta diverses limitacions importants. Existeix una àmplia heterogeneïtat en quant a metodologia, una limitada reproductibilitat dels resultats i una incapacitat per traduir els resultats a la pràctica clínica habitual. Segons els resultats del nostre estudi, molt probablement estigui en íntima relació amb el model experimental utilitzat. La validesa del model animal tindria una relació molt estreta amb els objectius del projecte proposat, però probablement hauria de basar-se primer en la semblança amb les característiques microanatòmiques entre els nervis de les espècies i també si fos possible en la semblança histoquímica de les estructures que el componen per intentar reproduir un perfil similar en la funció de cadascuna d'aquestes estructures.

Amb el nostre estudi, concloem que l'elecció del model animal podria variar depenent de l'objectiu precís de cada estudi. A tall d'exemple, si es considera necessari disposar de fascicles que presentin la mateixa circumferència, l'ús de les rates seria una elecció encertada ja que és la variable que més s'assembla a l'humà.

Per aquest motiu seria important que en dissenyar estudis preclínic de lesió nerviosa, injeccions intraneurals o toxicitat, es defineixi el model animal escollit, demostrant que el substrat microanatòmic del model animal és l'idoni per aconseguir els objectius i d'aquesta manera es podria realitzar una correcta extrapolació a l'humà. Encara que fins al moment actual no és gens freqüent en els estudis publicats, sí que seria recomanable que en el futur els autors verificuessin en estudis preliminars la semblança microanatòmica entre l'espècie animal escollida i les mostres humanes per poder obtenir conclusions vàlides. Si es persisteix en ignorar aquestes peculiaritats, s'haurà de reconèixer que els resultats i conclusions no poden ser directament extrapolats i només tenen validesa en l'àmbit de l'aplicació veterinària.

Un altre factor a tenir en compte, considerant les variacions que es presenten de forma habitual al llarg d'un nervi, és l'elecció de la localització exacta del nervi utilitzat¹⁵⁴, definint variables com CSA, números de fascicles, relació teixit neural i no neural, etc.

El nostre estudi demostra que l'arquitectura fascicular del nervi ciàtic difereix àmpliament entre els models mamífers estudiats, des de les espècies oligofasciculars (rata, conill i gos) a les espècies multifasciculars (ovella, porc i humà). Les variacions inclouen no només el topograma sinó també la mida, número de fascicles i proporció de teixit neural i no neural.

Així mateix, també ha quedat demostrat per primera vegada la utilitat de l'ecografia per realitzar estimacions de mides de nervis ciàtics en models experimentals animals degut a que presenta una bona correlació amb la mateixa variable mesurada histològicament. Aquest és un punt destacable a favor de l'ecografia que pot compensar les limitacions actuals de la tecnologia en relació a la nul·la capacitat de discernir entre diferents compartiments del nervi.

Atesa la importància dels diferents compartiments del nervi i amb l'objectiu d'avançar en l'estudi de les injeccions intraneurals, és imprescindible disposar de marcadors que romanguin en el lloc d'injecció de l'agulla, que no alterin el teixit, que siguin compatibles amb la majoria de tincions i que puguin ser processats sense deteriorar-se. Fins a l'actualitat, les substàncies més utilitzades com marcadors d'injecció intraneural durant els bloquejos d'anestèsia regional simulada en cadàvers han estat la tinta xinesa i el blau de metilè.

Un dels objectius d'aquest estudi va ser trobar una alternativa a la tinta xinesa i vam utilitzar sang heparinitzada per intentar evitar alguna de les limitacions que presenten els marcadors habituals. La tinta xinesa ha estat fins ara el marcador més utilitzat, però és una solució compactada amb partícules de petita mida però no uniformes, atès que la mida de la partícula depèn del fabricant. Per les seves característiques, les partícules no queden ben fixades al teixit i això pot produir que la fulla del micròtom desplaci aquestes partícules sobre la superfície d'una làmina tallada de 3 µm de gruix. La tinta xinesa també aglutina les partícules i visualment es veu una "taca", no podent-se identificar de forma individual les partícules. Aquest fet ocasiona que les imatges es puguin observar correctament a

Discussió

baixos augments però la dispersió de les partícules provoca un aspecte “brut” quan s'intenten aplicar augments més alts, ocasionant pèrdua de detalls d'interès.

Per una altra banda, el blau de metilè, una solució blava no particulada, presenta una gran capacitat de tintar i per aquest motiu de vegades es troba el colorant més enllà d'on es preveia per efecte de la manipulació durant la dissecció de la mostra. Aquest marcador és molt útil en disseccions macroscòpiques però desapareix durant el processament de les mostres per la seva anàlisi histològica, per efecte dels solvents utilitzats, el que inhabilita el seu ús per estudis microanatòmics.

Pel contrari, l'ús de sang heparinitzada ha demostrat ser compatible amb la majoria de tincions i, pel fet de ser eritròcits, les partícules són de mida i forma homogènia i predictable. Aquestes cèl·lules, pel fet de no disposar de nucli, són més elàstiques i poden deformar-se transitòriament per arribar fins als racons més petits, com ocorre en l'humà en la seva circulació pels petits capil·lars del cos. Els eritròcits es fixen perfectament al teixit on es dipositen, no produint-se cap desplaçament durant el procés de tall amb el micròtom. Les partícules són retingudes pel perineuri, epineuri i les múltiples membranes del circumneuri que limiten els compartiments grassos per fora del nervi. Els eritròcits heparinitzats es visualitzen com partícules independents, podent-se identificar clarament de forma aïllada i això produeix imatges nítides que permeten aplicar alts augments i analitzar amb detall els fenòmens que es produeixen dins del teixit. A més a més, l'aspecte translúcid dels eritròcits és una altra propietat d'interès ja que permet visualitzar les estructures que hi ha per sota, facilitant la identificació dels artefactes.

És important destacar que en el nostre treball no es va identificar cap extravasació del HBS injectat dins o fora del compartiment en el que es va dipositar. Aquesta propietat va possibilitar identificar el lloc exacte per on avançava la solució després de ser injectada. Dins del nervi, el marcador sempre es va localitzar dins del teixit extrafascicular, fora dels fascicles. També va permetre comprovar un fet menys conegut i és que en ocasions es pot produir una distribució del marcador entre les làmines perineurals del perineuri. I com a fet més destacat, l'evidència que el marcador no es va trobar dipositat dins dels fascicles malgrat que es van realitzar injeccions intraneurals deliberades per tal d'aconseguir aquest objectiu.

L'absència d'eritròcits dins dels fascicles és un fet no mencionat fins ara i que fa trontollar el dogma existent durant dècades, sobre les injeccions intrafasciculars com una opció fora de discussió. Els treballs d'Orebaugh en cadàver és probable que també presentessin resultats similars perquè, malgrat que es suggeria una propagació intrafascicular, l'augment òptic era relativament baix i les imatges no excessivament clares. A més, l'objectiu de l'estudi van ser arrels nervioses de la columna vertebral i troncs i no pas nervis perifèrics¹⁷⁸. Tot aquest seguit de troballes no havien pogut ser determinades fins ara amb l'ús dels marcadors convencionals com la tinta xinesa.

El marcador d'eritròcits heparinitzats ha permès comprovar el destí de la solució injectada en els bloquejos extraneurals estàndards, on aquest ocupava un o més compartiments grassos pròxims al nervi. Els adipòcits mantenien la seva integritat i els eritròcits es localitzaven entre els adipòcits que havien estat separats. La distribució del marcador dins d'aquests compartiments és el que es denomina en la pràctica clínica la forma de "donut" ecogràficament. Després de reexaminar les imatges i basant-nos en les imatges de Karmakar¹⁷⁹, es va evidenciar que les diferents membranes de circumneuri no són identificables amb els equips d'ecografia dels que disposem habitualment i és molt probable que la imatge de "donut" pugui ser el resultat de l'ocupació d'un o diversos compartiments grassos per part de la solució injectada.

En alguns casos, les imatges que pensàvem que eren injeccions extraneurals (entre epimisi i circumneuri o entre diferents membranes de circumneuri) van ser, de fet, parcialment intraneurals. Aquests resultats van en la mateixa línia d'estudis previs que ja demostraven que inclús en mans expertes, un de cada 6 bloquejos nerviosos ecoguiats eren en realitat intraneurals malgrat l'intent d'evitar-ho¹⁸⁰.

En relació al marcador que es pretenia validar, en comptes d'utilitzar sang emmagatzemada en bancs, es va optar per escollir sang fresca recollida directament de pacients humans degut a que la integritat dels glòbuls rojos emmagatzemats pot estar compromesa, afegint un efecte d'artefacte per l'ús d'eritròcits no íntegres. Es va procedir a heparinitzar i diluir fins aconseguir la solució desitjada i cal mencionar que la sang obtinguda de diferents subjectes no va entrar mai en contacte ni abans ni durant el bloqueig. Així mateix, es van

Discussió

estudiar microscòpicament les cèl·lules del HBS per descartar qualsevol possibilitat de destrucció cel·lular produïda per mecanismes antígen-anticòs.

Dins de les limitacions del nostre estudi cal mencionar que en l'estudi comparatiu de la microanatomia del nervi ciàtic procedent de diferents espècies animals no es van utilitzar primats per no poder-ne tenir disponibilitat. La mida mostral va ser petita, no obstant això, el número de mostres estudiades van ser suficients i van permetre observar les àmplies diferències entre l'arquitectura neural perifèrica de cada espècie.

En segon lloc, la mitja d'edat de les mostres humanes era més elevada que les mostres no humanes i podem assumir que amb el procés d'envelliment augmenta la quantitat de teixit interfascicular degut a l'estrenyiment de les artèries que irriguen els nervis, la proliferació endotelial i la fibrosi de la túnica mitja¹⁸¹⁻¹⁸³. No es van detectar diferències significatives en l'arquitectura nerviosa referent als sexes però no descartem que puguin existir donada la limitació de les mostres.

En tercer lloc, l'ús del microscopi òptic no ens va permetre diferenciar o quantificar aspectes com la mielinització, les cèl·lules glials, el llit vascular o el fenotip de les fibres nervioses; per aquest motiu, considerem que l'estudi podria ampliar-se en un futur amb estudis de microscòpia electrònica per aprofundir en la microestructura.

En relació a l'ús del nou biomarcador, la injecció del HBS en cadàver humà va ser realitzada sota visió ecogràfica i no directa. D'aquesta forma es va assumir que la injecció estava en el compartiment subepimisari, entre epimisari i circumneuri, o bé dins dels compartiments grassos limitats per dues membranes de circumneuri, seguint la pràctica clínica habitual durant la realització dels bloquejos anestèsics nerviosos. L'objectiu de l'estudi no era valorar la difusió de la solució a través de les membranes sinó avaluar si el HBS era capaç de mostrar dades sobre la distribució d'una solució injectada que ocorre immediatament després d'una injecció i així avançar en el coneixement de l'arquitectura microscòpica de les estructures internes dels nervis. Per contrari, les injeccions intraneurals en els nervis ciàtics d'animals es van realitzar sota visió directa després d'haver-los exposat per dissecció. En els animals es va modificar el procediment degut al

menor diàmetre dels nervis i per poder assegurar la injecció intraneural, evitant la pèrdua de marcador per fora del nervi.

NOVES LÍNIES D'INVESTIGACIÓ

*“Las limitaciones sólo viven en nuestra mente.
Pero si usamos nuestra imaginación,
las posibilidades se vuelven ilimitadas”*

Jamie Paolinetti.

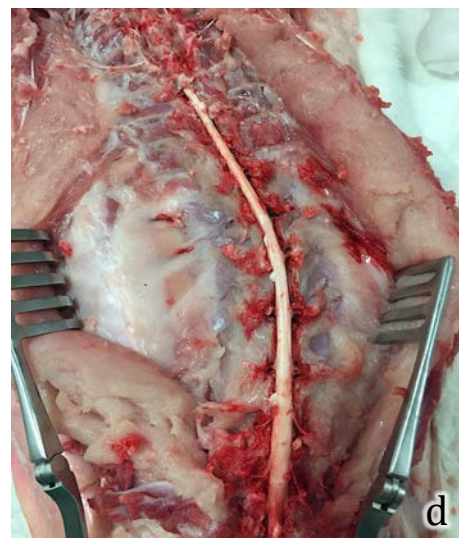
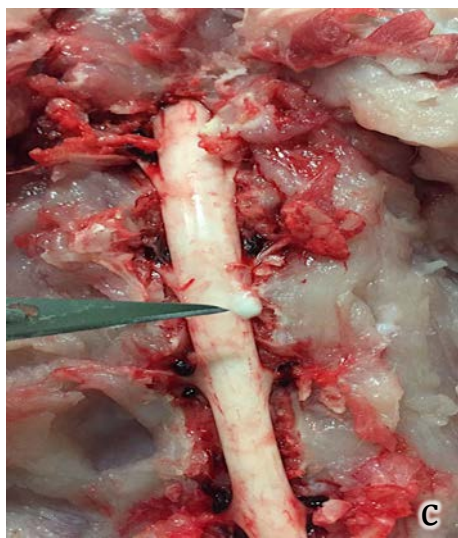
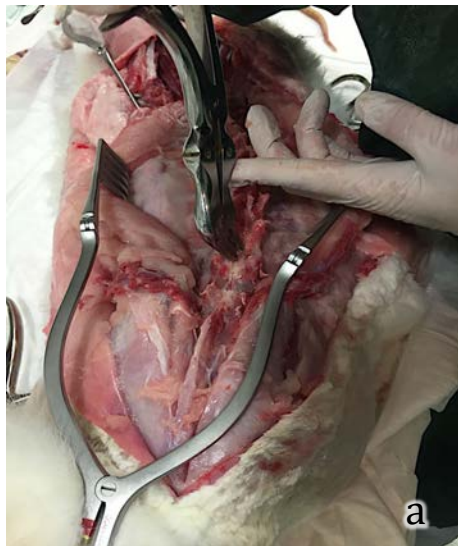
8. NOVES LÍNIES D'INVESTIGACIÓ.

Els resultats obtinguts en aquesta Tesi ens permetran aprofundir en aspectes bàsics en el camp de les lesions nervioses.

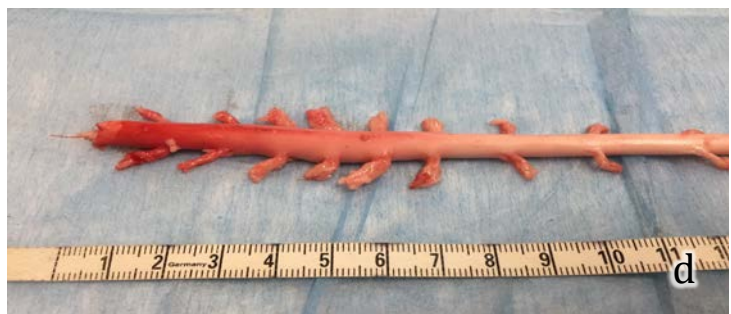
L'interès del grup de recerca s'està centrant en crear una base de dades de mostres histològiques, tant de nervi no humà com humà per poder comparar-los i establir similituds. Un cop caracteritzats els nervis i realitzades les comparacions, es procedirà a dur a terme estudis *in vivo* de lesió nerviosa associada a l'anestèsia regional.

Així mateix, no només es pretén avançar en el coneixement de l'SNP, sinó que estem iniciant noves línies en l'estudi de les meninges del SNC de models experimentals no humans (Fotografia 31, Fotografia 32 i Fotografia 33).

Noves Línies d'Investigació



Fotografia 31. Dissecció de les meninges de conill. (a): inici de laminectomia; (b): detall d'arrel nerviosa; (c): lesió dural accidental; (d): exposició de les meninges, (e): meninges completament disseccionades.



Fotografia 32. Dissecció de meninges de porc. (a): laminectomia parcial, (b): cua de cavall, (c): meninges completament disseccionades; (d): part cranial de les meninges; (e): part caudal de les meninges.



Fotografia 33. Dissecció de meninges d'ovella. (a): meninges completament disseccionades, (b): part cranial de les meninges, (c): part caudal de les meninges.

CONCLUSIONS

*“Somos lo que hacemos día a día;
de modo que la excelencia no es un acto,
sino un hábito”*

Aristóteles.

9. CONCLUSIONS.

En la present Tesi es confirma la hipòtesi generada sobre l'extensa variabilitat de la microanatomia i la necessitat de validació de l'espècie animal més compatible amb l'humà segons els objectius de l'estudi. També es confirma la utilitat de l'ús de sang heparinitzada com a marcador per a l'estudi dels esdeveniments que tenen lloc tant durant una injecció anestèsica en un bloqueig estàndard (per fora del nervi) com en una injecció inadvertida o intencionada dins d'un nervi.

Les conclusions detallades, en base als resultats, serien:

- 1) L'espècie animal més compatible amb l'humà depèn del nervi a comparar i de les característiques del nervi en qüestió. En el nostre estudi no es va demostrar que cap nervi ciàtic de les espècies estudiades fos comparable al ciàtic humà atès que presentaven diferències microestructurals ben diferenciades.
- 2) En experimentació animal és habitual l'ús de diferents espècies en el camp de les lesions nervioses però és important tenir en compte que l'extrapolació directa a l'humà pot comportar biaixos que poden invalidar l'extrapolació i aplicació en la pràctica clínica dels pacients.
- 3) Els nervis ciàtics (inclús de les espècies petites com rata i conill) són valorables i mesurables per ecografia i presenten una bona correlació amb les mesures histològiques.
- 4) La sang heparinitzada resulta un marcador útil ja que roman en el lloc d'injecció i no modifica les característiques histològiques de les mostres.
- 5) La sang heparinitzada permet un estudi més detallat de la destinació de les solucions injectades tant en un bloqueig estàndard com en les injeccions intraneurals, mostrant avantatges sobre l'ús tradicional de la injecció de la tinta xinesa.

BIBLIOGRAFIA

*“No hay atajos a cualquier lugar
que merezca la pena ir”*

Beverly Sills.

10. BIBLIOGRAFIA.

1. Liu Q, Wang X, Yi S. Pathophysiological changes of physical barriers of peripheral nerves after injury. *Front Neurosci*. 2018;12:597.
2. Ronchi G, Nicolino S, Raimondo S, et al. Functional and morphological assessment of a standardized crush injury of the rat median nerve. *J Neurosci Methods*. 2009;179(1):51-57.
3. Tubbs S. *Nerves and Nerve Injuries. Volume 1*. London: Elsevier Ltd; 2015.
4. Kim DH, Murovic JA, Tiel R, Kline DG. Management and outcomes in 353 surgically treated sciatic nerve lesions. *J Neurosurg*. 2004;101(1):8-17.
5. Kline DG, Kim D, Midha R, Harsh C, Tiel R. Management and results of sciatic nerve injuries: a 24-year experience. *J Neurosurg*. 1998;89(1):13-23.
6. Kallio PK, Vastamäki M. An analysis of the results of late reconstruction of 132 median nerves. *J Hand Surg Br*. 1993;18(1):97-105.
7. Meadows RM, Sengelaub DR, Jones KJ. Cellular Aspects of Nerve Injury and Regeneration. In: *Nerves and Nerve Injuries. Volume 2*. London: Elsevier Ltd; 2015:433-449.
8. Peltonen S, Alanne M, Peltonen J. Barriers of the peripheral nerve. *Tissue Barriers*. 2013;1(3):e24956.
9. Rice ASC, McMahon SB. Peripheral Nerve Injury Caused By Injection Needles Used in Regional Anaesthesia: Influence of Bevel Configuration, Studied in a Rat Model. *Br J Anaesth*. 1992;69(5):433-438.
10. Selander D, Dhunér K-GG, Lundborg G. Peripheral nerve injury due to injection needles used for regional anesthesia. *Acta anaesth scand*. 1977;21(3):182-188.
11. Welch MB, Brummett CM, Welch TD, et al. Perioperative peripheral nerve injuries: a retrospective study of 380,680 cases during a 10-year period at a single institution. *Anesthesiology*. 2009;111(3):490-497.
12. Kretschmer T, Heinen C. Iatrogenic Injuries of the Nerves. In: *Nerves and Nerve Injuries. Volume 2*. London: Elsevier Ltd; 2015:557-585.
13. Castillo-Galván ML, Maximiliano Martínez-Ruiz F, De La Garza-Castro Ó, et al. Estudio de la lesión nerviosa periférica en pacientes atendidos por traumatismos. *Gac Med Mex*. 2014;150:527-532.

Bibliografía

14. Geuna S, Raimondo S, Ronchi G, et al. Chapter 3: Histology of the peripheral nerve and changes occurring during nerve regeneration. *Int Rev Neurobiol.* 2009;87:27-46.
15. Seddon H. *Surgical Disorders of the Peripheral Nerves.* Edinburgh: Churchill Livingstone; 1972.
16. Kaplan S, Odaci E, Unal B, Sahin B, Fornaro M. Chapter 2: Development of the peripheral nerve. *Int Rev Neurobiol.* 2009;87:9-26.
17. Morrison SJ, White PM, Zock C, Anderson DJ. Prospective identification, isolation by flow cytometry, and in vivo self-renewal of multipotent mammalian neural crest stem cells. *Cell.* 1999;96(5):737-749.
18. Reina MA, Arriazu R, Collier CB, Sala-Blanch X, Izquierdo L, de Andrés J. Electron microscopy of human peripheral nerves of clinical relevance to the practice of nerve blocks. A structural and ultrastructural review based on original experimental and laboratory data. *Rev española Anestesiología y Reanimación.* 2013;60(10):552-562.
19. Reina MA, Sala-Blanch X, Arriazu R, Machés F. Microscopic Morphology and Ultrastructure of Human Peripheral Nerves. In: *Nerves and Nerve Injuries.* London: Elsevier Ltd; 2015:91-104.
20. Wikinski JA. *Complicaciones Neurológicas de La Anestesia Regional Periférica y Central: Diagnóstico, Prevención y Tratamiento.* 2nd ed. Editorial Médica Panamericana; 2011.
21. Miko M, Varga I. Histologic Examination of Peripheral Nerves. In: *Nerves and Nerve Injuries.* London: Elsevier Ltd; 2015:79-89.
22. Mescher AL. *Junqueira's Basic Histology.* 12th ed. Singapore: McGraw-Hill; 2010.
23. Monk KR, Wu J, Williams JP, et al. Mast cells can contribute to axon-glia dissociation and fibrosis in peripheral nerve. In: *Neuron Glia Biology.* Vol 3. ; 2007:233-244.
24. Oldfors A. Macrophages in peripheral nerves. An ultrastructural and enzyme histochemical study on rats. *Acta Neuropathol.* 1980;49(1):43-49.
25. Olsson Y. Mast cells in human peripheral nerve. *Acta Neurol Scand.* 1971;47(3):357-368.
26. Ushiki T, Ide C. Three-dimensional organization of the collagen fibrils in the rat sciatic nerve as revealed by transmission- and scanning electron microscopy. *Cell Tissue Res.* 1990;260(1):175-184.

27. Reina MA, De Andrés JA, Hadzic A, Prats-Galino A, Sala-Blanch X, van Zundert AAJ. *Atlas of Functional Anatomy for Regional Anesthesia and Pain Medicine*. Cham: Springer International Publishing; 2015.
28. Inokuchi T, Yokoyama R, Higashi R, Takahashi Y, Miyajima S. Ultrastructure of the perineurial cell of the sciatic nerve in rats—a transmission and scanning electron microscopic study. *Kurume Med J*. 1991;38(4):221-232.
29. Sunderland S. The connective tissues of peripheral nerves. *Brain*. 1965;88(4):841-854.
30. Sunderland S. The intraneural topography of the radial, median and ulnar nerves. *Brain*. 1945;68:243-299.
31. Sunderland S, Marshall RD, Swaney WE. The intraneural topography of the circumflex musculocutaneous and obturator nerve. *Brain*. 1959;82(1):116-129.
32. Sunderland S, Ray LJ. The intraneural topography of the sciatic nerve and its popliteal divisions in man. *Brain*. 1948;71(Pt. 3):242-273.
33. Sunderland S, Bradley KC. The cross-sectional area of peripheral nerve trunks devoted to nerve fibers. *Brain*. 1949;72(3):428-449.
34. Prats-Galino A, Capek M, Reina MA, et al. 3D reconstruction of peripheral nerves from optical projection tomography images: A method for studying fascicular interconnections and intraneural plexuses. *Clin Anat*. 2018;31(3):424-431.
35. Aguayo AJ, Bray GM, Terry LC, Swezey E. Three dimensional analysis of unmyelinated fibers in normal and pathologic autonomic nerves. *J Neuropathol Exp Neurol*. 1976;35(2):136-151.
36. Martinez-Pereira M, Zancan D. Comparative Anatomy of the Peripheral Nerves. In: *Nerves and Nerve Injuries. Volume 1*. London: Elsevier Ltd; 2015:55-77.
37. Ross M., Paulina W. *Histology: A Text and Atlas: With Correlated Cell and Molecular Biology*. 6th ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 2011.
38. Berthold CH, Dyck PJ, Thomas PK. Microscopic anatomy of the peripheral nervous system. In: Dyck peter J, ed. *Peripheral Neuropathy*. 4th ed. Philadelphia: Elsevier Saunders; 2005:35-91.
39. Cui D, Naftel JP, Lynch JC, et al. *Atlas of Histology with Functional and Clinical Correlations*. Baltimore/Philadelphia: Wolters Kluwer/Lippincott Williams and Wilkins; 2011.
40. Dudek RW. *High-Yield Histopathology*. 2nd ed. Philadelphia: Wolters Kluwer; 2011.

Bibliografía

41. Ochoa J. The unmyelinated nerve fibre. In: *The Peripheral Nerve*. London: Landon, D.; 1976:106-158.
42. Coggeshall RE, Coulter JD, Willis WD. Unmyelinated axons in the ventral roots of the cat lumbosacral enlargement. *J Comp Neurol*. 1974;153(1):39-58.
43. Risling M, Hildebrand C. Occurrence of unmyelinated axon profiles at distal, middle and proximal levels in the ventral root L7 of cats and kittens. *J Neurol Sci*. 1982;56(2-3):219-231.
44. Terzis JK, Smith KL. *The Peripheral Nerve. Structure, Function, and Reconstruction*. New York: Raven Press; 1990.
45. Barrett K, Brooks H, Boitano S, Barman S. *Ganong's Review of Medical Physiology*. 23rd ed. Mc Graw Hill Medical; 2009.
46. Alvites R, Rita Caseiro A, Santos Pedrosa S, et al. Peripheral nerve injury and axonotmesis: State of the art and recent advances. *Cogent Med*. 2018;5(1).
47. Schalow G, Zäch GA, Warzok R. Classification of human peripheral nerve fibre groups by conduction velocity and nerve fibre diameter is preserved following spinal cord lesion. *J Auton Nerv Syst*. 1995;52(2-3):125-150.
48. Brull R, Hadzic A, Reina MA, Barrington MJ. Pathophysiology and Etiology of Nerve Injury Following Peripheral Nerve Blockade. *Reg Anesth Pain Med*. 2015;40(5):479-490.
49. Bustamante JL. Estudio comparativo de la reparación del sistema nervioso periférico con técnicas microquirúrgicas experimentales de sutura epineural en condiciones de distintos grados de tensión. 2015.
50. Selander D, Edshage S, Wolff T. Paresthesiae or no paresthesiae? Nerve lesions after axillary blocks. *Acta Anaesthesiol Scand*. 1979;23:27-33.
51. Farber SJ, Saheb-Al-Zamani M, Zieske L, et al. Peripheral nerve injury after local anesthetic injection. *Anesth Analg*. 2013;117(3):731-739.
52. Cheng KI, Wang HC, Wu YC, et al. Sciatic nerve intrafascicular lidocaine injection-induced peripheral neuropathic pain: Alleviation by systemic minocycline administration. *Clin J Pain*. 2016.
53. Lim TKY, Shi XQ, Johnson JM, et al. Peripheral Nerve Injury Induces Persistent Vascular Dysfunction and Endoneurial Hypoxia, Contributing to the Genesis of Neuropathic Pain. *J Neurosci*. 2015.

54. Kobayashi J, Mackinnon SE, Langer JC, Hertl MC, Hunter DA, Tarasidis G. The effect of ammonium sulfate injection on peripheral nerve. *J Reconstr Microsurg.* 1997;13(6):389-396.
55. Gao YM, Weng CS, Wang XL. Changes in nerve microcirculation following peripheral nerve compression. *Neural Regen Res.* 2013;8(11):1041-1047.
56. Seddon H. Peripheral nerve injuries in Great Britain during World War II; a review. *Arch Neurol Psychiatry.* 1950;63(1):171-173.
57. Choi EJ, Choi YM, Jang EJ, Kim JY, Kim TK, Kim KH. Neural ablation and regeneration in pain practice. *Korean J Pain.* 2016;29(1):3-11.
58. Burnett MG, Zager EL. Pathophysiology of peripheral nerve injury: a brief review. *Neurosurg Focus.* 2004;16(5):E1.
59. Campbell WW. Evaluation and management of peripheral nerve injury. *Clin Neurophysiol.* 2008;119(9):1951-1965.
60. López Prats F. Lesiones nerviosas periféricas. Síndromes canaliculares. Lesiones Sistema Nervioso Periférico.
61. Sunderland SS, Williams HB. Nerve Injuries and Their Repair: A Critical Appraisal. *Plast Reconstr Surg.* 1992;89(6):1170.
62. Chhabra A, Carrino J. Current MR Neurography Techniques and Whole-Body MR Neurography. *Semin Musculoskelet Radiol.* 2015;19(02):079-085.
63. Radtke C, Vogt PM. Peripheral Nerve Regeneration: A Current Perspective. *Eplasty.* 2009;9:e47.
64. Gaudet AD, Popovich PG, Ramer MS. Wallerian degeneration: gaining perspective on inflammatory events after peripheral nerve injury. *J Neuroinflammation.* 2011;8(1):110.
65. Sánchez M. Traumatismos de los nervios periféricos. Síndrome de irritación nerviosa. In: *Traumatología Del Aparato Locomotor.* Salamanca; 1996:160-162.
66. Hall S. The response to injury in the peripheral nervous system. *J Bone Jt Surg - Br Vol.* 2005;87-B(10):1309-1319.
67. Menorca RMGG, Fussell TS, Elfar JC. Nerve Physiology: mechanisms of injury and recovery. *Hand Clin.* 2013;29(3):317-330.
68. Sunderland S. Rate of regeneration in human peripheral nerves; analysis of the interval between injury and onset of recovery. *Arch Neurol Psychiatry.* 1947;58(3):251-295.

Bibliografia

69. Bélanger E, Henry FP, Vallée R, et al. In vivo evaluation of demyelination and remyelination in a nerve crush injury model. *Biomed Opt Express*. 2011;2(9):2698-2708.
70. Chlebicki CA, Lee AD, Jung W, et al. Preliminary investigation on use of high-resolution optical coherence tomography to monitor injury and repair in the rat sciatic nerve. *Lasers Surg Med*. 2010;42(4):306-312.
71. Menovsky T, Beek JF. Laser, fibrin glue, or suture repair of peripheral nerves: a comparative functional, histological and morphometric study in the rat sciatic nerve. *J Neurosurg*. 2001;95(4):694-699.
72. Aguayo AJ, Peyronnard JM, Bray GM. A quantitative ultrastructural study of regeneration from isolated proximal stumps of transected unmyelinated nerves. *J Neuropathol Exp Neurol*. 1973;32(2):256-270.
73. Davis KD, Taylor KS, Anastakis DJ. Nerve Injury Triggers Changes in the Brain. *Neuroscientist*. 2011;17(4):407-422.
74. Lundborg G. Nerve injury and repair - A challenge to the plastic brain. *J Peripher Nerv Syst*. 2003;8(4):209-226.
75. Lee M, Guyuron B. Postoperative Neuromas. In: *Nerves and Nerve Injuries. Volume 2*. London: Elsevier Ltd; 2015:99-112.
76. Yüksel F, Kislaoğlu E, Durak N, Ucar C, Karacaoglu E. Prevention of painful neuromas by epineural ligatures, flaps and grafts. *Br J Plast Surg*. 1997.
77. Powers C. A brief history of surgery for peripheral nerve sheath tumors. *Neurosurg Focus*. 2007.
78. Fitzgerald M, McKelvey R. Nerve injury and neuropathic pain - A question of age. *Exp Neurol*. 2016;275:296-302.
79. Lee FC, Singh H, Nazarian LN, Ratliff JK. High-resolution ultrasonography in the diagnosis and intraoperative management of peripheral nerve lesions. *J Neurosurg*. 2011;114(1):206-211.
80. Spicher C, Kohut G, Miauton J. At which stage of sensory recovery can a tingling sign be expected? a review and proposal for standardization and grading. *J Hand Ther*. 12(4):298-308.
81. Harper CM. Preoperative and intraoperative electrophysiologic assessment of brachial plexus injuries. *Hand Clin*. 2005;21(1):39-46.
82. Lee DH, Claussen GC, Oh S. Clinical nerve conduction and needle electromyography studies. *J Am Acad Orthop Surg*. 2004;12(4):276-287.

83. Lebus GF, Watson JT, Lee DH. Techniques for Intraoperative Peripheral Nerve Assessment and Implications for Treatment. In: *Nerves and Nerve Injuries. Volume 1*. London: Elsevier Ltd; 2015.
84. Midha R, Alaqeel A. Technical Aspects of Nerve Repair. In: *Nerves and Nerve Injuries. Volume 2*. London: Elsevier Ltd; 2015:225-236.
85. Jaquet JB, Luijsterburg AJM, Kalmijn S, Kuypers PDL, Hofman A, Hovius SER. Median, ulnar, and combined median-ulnar nerve injuries: Functional outcome and return to productivity. *J Trauma*. 2001;51(4):687-692.
86. Ruijs ACJJ, Jaquet J-BB, Kalmijn S, Giele H, Hovius SERR. Median and ulnar nerve injuries: A meta-analysis of predictors of motor and sensory recovery after modern microsurgical nerve repair. *Plast Reconstr Surg*. 2005;116(2):484-94; discussion 495-6.
87. Scholz T, Krichevsky A, Sumarto A, et al. Peripheral nerve injuries: an international survey of current treatments and future perspectives. *J Reconstr Microsurg*. 2009;25(6):339-344.
88. Vlassakov K V., Sala-Blanch X. Ultrasound of the Peripheral Nerves. In: *Nerves and Nerve Injuries*. London: Elsevier Ltd; 2015.
89. Jacobson JA. Musculoskeletal ultrasound: Focused impact on MRI. *Am J Roentgenol*. 2009;193(3):619-627.
90. Kara M, Özçakar L, De Muynck M, Tok F, Vanderstraeten G. Musculoskeletal ultrasound for peripheral nerve lesions. *Eur J Phys Rehabil Med*. 2012;48(4):665-674.
91. Jain S, Mannan K. The Diagnosis and Management of Morton's Neuroma. *Foot Ankle Spec*. 2013;6(4):307-317.
92. Solbiati L, de Pra L, Ierace T, Bellotti E, Derchi LE. High-resolution sonography of the recurrent laryngeal nerve: Anatomic and pathologic considerations. *Am J Roentgenol*. 1985;145(5):989-993.
93. Fornage BD. Peripheral nerves of the extremities: imaging with US. *Radiology*. 1988;167(1):179-182.
94. Cartwright MS, Passmore L V., Yoon J-SS, Brown ME, Caress JB, Walker FO. Cross-sectional area reference values for nerve ultrasonography. *Muscle and Nerve*. 2008;37(5):566-571.
95. Suk JI, Walker FO, Cartwright MS. Ultrasonography of Peripheral Nerves. *Curr Neurol Neurosci Rep*. 2013;13(2):328.

Bibliografía

96. Tagliafico A, Cadoni A, Fisci E, Bignotti B, Padua L, Martinoli C. Reliability of side-to-side ultrasound cross-sectional area measurements of lower extremity nerves in healthy subjects. *Muscle and Nerve*. 2012;46(5):717-722.
97. Won SJ, Kim B-JJ, Park KS, Kim SH, Yoon JS. Measurement of cross-sectional area of cervical roots and brachial plexus trunks. *Muscle and Nerve*. 2012;46(5):711-716.
98. Won SJ, Kim B-JJ, Park KS, Yoon JS, Choi H. Reference values for nerve ultrasonography in the upper extremity. *Muscle and Nerve*. 2013;47(6):864-871.
99. Cartwright MS, Mayans DR, Gillson NA, Griffin LP, Walker FO. Nerve cross-sectional area in extremes of age. *Muscle and Nerve*. 2013;47(6):890-893.
100. La Grange P, Foster PA, Pretorius LK, Grange PDPL, Foster PA, Pretorius LK. Application of the Doppler ultrasound bloodflow detector in supraclavicular brachial plexus block. *Br J Anaesth*. 1978;50(9):965-967.
101. Kapral S, Krafft P, Eibenberger K, Fitzgerald R, Gosch M, Weinstabl C. Ultrasound-guided supraclavicular approach for regional anesthesia of the brachial plexus. *Anesth Analg*. 1994;78(3):507-513.
102. Pauchet V, Sourdat P. *L'anesthésie Regionale*. Paris: Octave Dion; 1914.
103. Altermatt FR, Cummings TJ, Auten KM, Baldwin MF, Belknap SW, Reynolds JD. Ultrasonographic appearance of intraneural injections in the porcine model. *Reg Anesth Pain Med*. 2010;35(2):203-206.
104. Chan VWSS, Brull R, McCartney CJLL, Xu D, Abbas S, Shannon P. An ultrasonographic and histological study of intraneural injection and electrical stimulation in pigs. *Anesth Analg*. 2007;104(5):1281-4, tables of contents.
105. Lupu CM, Kiehl T-R, Chan VWS, El-Beheiry H, Madden M, Brull R. Nerve expansion seen on ultrasound predicts histologic but not functional nerve injury after intraneural injection in pigs. *Reg Anesth Pain Med*. 2010;35(2):132-139.
106. Sala Blanch X, López AM, Carazo J, et al. Intraneural injection during nerve stimulator-guided sciatic nerve block at the popliteal fossa. *Br J Anaesth*. 2009;102(6):855-861.
107. Morau D, Levy F, Bringuier S, et al. Ultrasound-guided evaluation of the local anesthetic spread parameters required for a rapid surgical popliteal sciatic nerve block. *Reg Anesth Pain Med*. 2010;35(6):559-564.
108. Servicio de Microscopía Electrónica UP de V. Microscopía electrónica de barrido.
109. Becú-Villalobos D. Medicina traslacional, ¿moda o necesidad? *Med*. 2014;74(2):170-172.

110. Butler D. Translational research: Crossing the valley of death. *Nature*. 2008;453(7197):840-842.
111. McDaid J, Scott CJ, Kissenpfennig A, Chen H, Martins PN. The utility of animal models in developing immunosuppressive agents. *Eur J Pharmacol*. 2015;759:295-302.
112. Denayer T, Stöhr T, Van Roy M. Animal models in translational medicine: Validation and prediction. *New Horizons Transl Med*. 2014;2(1):5-11.
113. Wendler A, Wehling M. The translatability of animal models for clinical development: biomarkers and disease models. *Curr Opin Pharmacol*. 2010;10(5):601-606.
114. Boada Saña M, Colom Comí A, Castelló Echeverría N. La experimentación animal. 2011.
115. Montoliu L. ¿Cuántos animales se usan en España para experimentación? — Cuaderno de Cultura Científica.
116. *Informe Sobre Usos de Animales de Experimentación y Otros Fines Científicos, Incluyendo La Docencia En 2017*. Madrid; 2017.
117. Court WE. Pharmacy from the ancient world to 1100 AD. In: *Making Medicines: A Brief History of Pharmacy and Pharmaceuticals*. Stuart And. London: Pharmaceutical Press; 2005:21-36.
118. Maehle AH, Trohler U. Animal experimentation from antiquity to the end of the Eighteenth Century: attitudes and arguments. *Vivisect Hist Perspect / Ed by Nicolaas A Rupke*. 1987.
119. Von Staden H. *Herophilus: The Art of Medicine in Early Alexandria: Edition, Translation, and Essays*. Cambridge: Cambridge University Press; 1989.
120. Franco NH. Animal Experiments in Biomedical Research: A Historical Perspective. *Animals*. 2013;3(1):238-273.
121. Montague B. The second book of Francis Bacon on the proficiency and advancement of learning, divine and human. In: *The Works of Francis Bacon: Baron of Verulam, Viscount St. Albans, and Lord High Chancellor of England*. Philadelphia: Wildside Press; 1842.
122. Regan T, Singer P. *Animal Rights and Human Obligations*. Prentice Hall; 1989.
123. Steiner G. *Anthropocentrism and Its Discontents: The Moral Status of Animals in the History of Western Philosophy*. University of Pittsburgh Press; 2005.

Bibliografía

124. Míguez Santiyán M de. P, Largo Bermejo JD, Pérez López M. *Perspectivas de La Experimentación Animal En Ciencias Biomédicas*.
125. Macdonald G. *The Epidemiology and Control of Malaria*. London: Oxford University Press; 1957.
126. Álvarez-Díaz JA. La controversia sobre la vivisección. *Acta Bioeth*. 2007;13(1).
127. García-Sancho M. Animal breeding in the age of biotechnology: the investigative pathway behind the cloning of Dolly the sheep. *Hist Philos Life Sci*. 2015;37(3):282-304.
128. DeGrazia D, Sebo J. Necessary Conditions for Morally Responsible Animal Research. *Cambridge Q Healthc Ethics*. 2015;24(04):420-430.
129. Russell, W.M.S. and Burch RL. *The Principles of Humane Experimental Technique*. London: Universities Federation for Animal Welfare; 1959.
130. Tannenbaum J, Bennett BT. Russell and Burch's 3Rs then and now: the need for clarity in definition and purpose. *J Am Assoc Lab Anim Sci*. 2015;54(2):120-132.
131. Flecknell P. Replacement, reduction and refinement. *ALTEX*. 2002;19(2):73-78.
132. Farnaud S. The evolution of the Three Rs. *Altern Lab Anim*. 2009;37(3):249-254.
133. Griffin G, Clark JM, Zurlo J, Ritskes-Hoitinga M. Scientific uses of animals: harm-benefit analysis and complementary approaches to implementing the three Rs. *Rev Sci Tech*. 2014;33(1):265-272.
134. Buchanan-Smith HM, Rennie A, Vitale A, Pollo S, Prescott MJ MD. Harmonising the definition of refinement. *Anim Welf*. 2005;14:379-384.
135. *Directiva 2010/63/UE Del Parlamento Europeo y Del Consejo*.; 2010.
136. *RD 53/2013. Boletín Oficial Del Estado*.; 2013.
137. Diari Oficial de la Generalitat de Catalunya. Departamento de Ganadería, Agricultura y Pesca. 1997:9169-75.
138. Cirillo V, Clements BA, Guarino V, Bushman J, Kohn J, Ambrosio L. A comparison of the performance of mono- and bi-component electrospun conduits in a rat sciatic model. *Biomaterials*. 2014;35(32):8970-8982.
139. Mackinnon SE, Hudson AR, Hunter DA. Histologic assessment of nerve regeneration in the rat. *Plast Reconstr Surg*. 1985;75(3):384-388.

140. Fullarton AC, Lenihan D V., Myles LM, Glasby MA. Assessment of the method and timing of repair of a brachial plexus traction injury in an animal model for obstetric brachial plexus palsy. *J Hand Surg Br.* 2002;27(1):13-19.
141. Pavić R, Pavić ML, Tvrdeić A, Tot OK, Heffer M. Rat sciatic nerve crush injury and recovery tracked by plantar test and immunohistochemistry analysis. *Coll Antropol.* 2011;35 Suppl 1:93-100.
142. Meuli-Simmen C, Meuli M, Yingling CD, et al. Midgestational sciatic nerve transection in fetal sheep results in absent nerve regeneration and neurogenic muscle atrophy. *Plast Reconstr Surg.* 1997;99(2):486-492.
143. Nichols CM, Myckatyn TM, Rickman SR, Fox IK, Hadlock T, Mackinnon SE. Choosing the correct functional assay: a comprehensive assessment of functional tests in the rat. *Behav Brain Res.* 2005;163(2):143-158.
144. Hadzic A, Dilberovic F, Shah S, et al. Combination of intraneural injection and high injection pressure leads to fascicular injury and neurologic deficits in dogs. *Reg Anesth Pain Med.* 2004;29(5):417-423.
145. Steinfeldt T, Nimphius W, Werner T, et al. Nerve injury by needle nerve perforation in regional anaesthesia: does size matter? *Br J Anaesth.* 2010;104(2):245-253.
146. Gentili F, Hudson A, Kline DG, Hunter D. Peripheral nerve injection injury: An experimental study. *Neurosurgery.* 1979;4(3):244-253.
147. Tarlov I, Perlmutter I, Berman AJ. Paralysis caused by penicillin injection; mechanism of complication a warning. *J Neuropathol Exp Neurol.* 1951;10(2):158-176.
148. Tsai TP, Vuckovic I, Dilberovic F, et al. Intensity of the stimulating current may not be a reliable indicator of intraneural needle placement. *Reg Anesth Pain Med.* 2008;33(3):207-210.
149. Choyce A, Chan VW, Middleton WJ, Knight PR, Peng P, McCartney CJ. What is the relationship between paresthesia and nerve stimulation for axillary brachial plexus block? *Reg Anesth Pain Med.* 2001;26(2):100-104.
150. Urmey WF, Stanton J. Inability to consistently elicit a motor response following sensory paresthesia during interscalene block administration. *Anesthesiology.* 2002;96(3):552-554.
151. Vermeylen K, Hermans M, Soetens F, et al. Opening Injection Pressure Is Higher in Intraneural Compared With Perineural Injections During Simulated Nerve Blocks of the Lower Limb in Fresh Human Cadavers. *Reg Anesth Pain Med.* 2017;42(3):362-367.

Bibliografia

152. Ross S, Edwards K, McFadden K, Bigeleisen P, Orebaugh S. Pressures of Injection in a Cadaver Model of Peripheral Nerve Blockade. *J Anesth Clin Res*. 2014;5(10).
153. Kapur E, Vuckovic I, Dilberovic F, et al. Neurologic and histologic outcome after intraneural injections of lidocaine in canine sciatic nerves. *Acta Anaesthesiol Scand*. 2007;51(1):101-107.
154. Moayeri N, Groen GJ. Differences in quantitative architecture of sciatic nerve may explain differences in potential vulnerability to nerve injury, onset time, and minimum effective anesthetic volume. *Anesthesiology*. 2009;111(5):1128-1134.
155. Moayeri N, Bigeleisen PE, Groen GJ. Quantitative architecture of the brachial plexus and surrounding compartments, and their possible significance for plexus blocks. *Anesthesiology*. 2008;108(2):299-304.
156. Scheib J, Höke A. Advances in peripheral nerve regeneration. *Nat Rev Neurol*. 2013;9(12):668-676.
157. Kruisselbrink R, Chin KJ. Anesthesia of the Peripheral Nerves. In: *Nerves and Nerve Injuries. Volume 1*. London: Elsevier Ltd; 2015:251-270.
158. Barrington MJ, Watts SA, Gledhill SR, et al. Preliminary results of the Australasian Regional Anaesthesia Collaboration: a prospective audit of more than 7000 peripheral nerve and plexus blocks for neurologic and other complications. *Reg Anesth Pain Med*. 2009;34(6):534-541.
159. Fredrickson MJ, Kilfoyle DH. Neurological complication analysis of 1000 ultrasound guided peripheral nerve blocks for elective orthopaedic surgery: a prospective study. *Anaesthesia*. 2009;64(8):836-844.
160. Orebaugh SL, Kentor ML, Williams BA. Adverse outcomes associated with nerve stimulator-guided and ultrasound-guided peripheral nerve blocks by supervised trainees: update of a single-site database. *Reg Anesth Pain Med*. 2012;37(6):577-582.
161. Auroy Y, Benhamou D, Bargues L, et al. Major complications of regional anesthesia in France: The SOS Regional Anesthesia Hotline Service. *Anesthesiology*. 2002;97(5):1274-1280.
162. Jeng CL, Rosenblatt M a. Intraneural injections and regional anesthesia: The known and the unknown. *Minerva Anesthesiol*. 2011;77(January):54-58.
163. Bigeleisen PE. Nerve puncture and apparent intraneural injection during ultrasound-guided axillary block does not invariably result in neurologic injury. *Anesthesiology*. 2006;105:779-783.

164. Bigeleisen PE, Moayeri N, Groen GJ. Extraneural versus intraneural stimulation thresholds during ultrasound-guided supraclavicular block. *Anesthesiology*. 2009;110(6):1235-1243.
165. Russon K, Blanco R. Accidental intraneural injection into the musculocutaneous nerve visualized with ultrasound. *Anesth Analg*. 2007;105(5):1504-5, table of contents.
166. Sala-Blanch X, López AM, Pomés J, Valls-Sole J, García AI, Hadzic A. No clinical or electrophysiologic evidence of nerve injury after intraneural injection during sciatic popliteal block. *Anesthesiology*. 2011;115(3):589-595.
167. Whitlock EL, Brenner MJ, Fox IK, Moradzadeh A, Hunter DA, Mackinnon SE. Ropivacaine-induced peripheral nerve injury in the rodent model. *Anesth Analg*. 2010;111(1):214-220.
168. Borgeat A, Ekatodramis G, Kalberer F, Benz C. Acute and nonacute complications associated with interscalene block and shoulder surgery. *Anesthesiology*. 2001;95(4):875-880.
169. Brull R, McCartney CJLL, Chan VWSS, El-Beheiry H. Neurological complications after regional anesthesia: contemporary estimates of risk. *Anesth Analg*. 2007;104(4):965-974.
170. Steinfeldt T, Poeschl S, Nimphius W, et al. Forced needle advancement during needle-nerve contact in a porcine model: Histological outcome. *Anesth Analg*. 2011;113(2):417-420.
171. Hogan QH. Pathophysiology of Peripheral Nerve Injury During Regional Anesthesia. *Reg Anesth Pain Med*. 2008;33(5):435-441.
172. Sugimoto Y, Takayama S, Horiuchi Y, Toyama Y. An experimental study on the perineurial window. *J Peripher Nerv Syst*. 2002;7(2):104-111.
173. Kirchmair L, Ströhle M, Löscher WN, Kreutziger J, Voelckel WG, Lirk P. Neurophysiological effects of needle trauma and intraneural injection in a porcine model: a pilot study. *Acta Anaesthesiol Scand*. 2016;60(3):393-399.
174. Maruyama M. Long-tapered double needle used to reduce needle stick nerve injury. *Reg Anesth*. 1997;22(2):157-160.
175. Sala-Blanch X, Ribalta T, Rivas E, et al. Structural injury to the human sciatic nerve after intraneural needle insertion. *Reg Anesth Pain Med*. 2009;34(3):201-205.
176. Yang S, Abrahams MS, Hurn PD, Grafe MR, Kirsch JR. Local anesthetic Schwann cell toxicity is time and concentration dependent. *Reg Anesth Pain Med*. 2011;36(5):444-451.

Bibliografia

177. Myers RR, Kalichman MW, Reisner LS, Powell HC. Neurotoxicity of local anesthetics: Altered perineurial permeability, edema, and nerve fiber injury. *Anesthesiology*. 1986;64(1):29-35.
178. Orebaugh SL, McFadden K, Skorupan H, Bigeleisen PE. Subepineurial injection in ultrasound-guided interscalene needle tip placement. *Reg Anesth Pain Med*. 2010;35(5):450-454.
179. Karmakar M. High-definition and three-dimensional volumetric ultrasound imaging of the sciatic nerve. In: *Atlas of Functional Anatomy for Regional Anesthesia and Pain Medicine*. New York: Springer; 2015:355-383.
180. Krediet AC, Moayeri N, Bleys RLAWAW, Groen GJ. Intraneural or Extraneural: diagnostic accuracy of ultrasound assessment for localizing low-volume injection. *Reg Anesth Pain Med*. 2014;39(5):409-413.
181. Tohgi H, Tsukagoshi H, Toyokura Y. Quantitative changes with age in normal sural nerves. *Acta Neuropathol*. 1977;38(3):213-220.
182. Ceballos D, Cuadras J, Verdú E, Navarro X. Morphometric and ultrastructural changes with ageing in mouse peripheral nerve. *J Anat*. 1999;195(4):563-576.
183. Jacobs JM, Love S. Qualitative and quantitative morphology of human sural nerve at different ages. *Brain*. 1985;108(4):897-924.

ANNEXOS

*“Lo que necesitamos es más gente
especializada en lo imposible”*

Theodore Roosevelt.

11. ANNEXOS.

És essencial destacar la importància de la mida de l'agulla en els estudis de lesió intraneural respecte al nervi utilitzat (*Fotografia 34*). Per aquest motiu, el nostre grup d'investigació proposa les següents equivalències per poder fer una extrapolació posterior a l'humà (*Taula 5*):



Fotografia 34. Relació de l'agulla i el teixit nerviós.

	Rata	Conill	Porc	Ovella	Humà
Àrea circumferència (mm ²)	1	3	20	17	56
Diàmetre major (mm)	2,4	4,5	10,5	11,4	10
Diàmetre menor (mm)	0,6	1,1	2,5	2,3	5,8
Equivalència agulla	?	30G	25G	26G	22G

Taula 5. Relació d'agulles corresponents a cada espècie dependent de la mida ecogràfica del nervi.

Annexos

De manera gràfica, la importància de la mida de l'agulla s'exemplifica en el següent esquema, on es compara l'àrea d'una agulla d'ús habitual en les tècniques d'anestèsia regional en humans i les àrees dels nervis de les espècies animals usades en estudis d'experimentació animal:

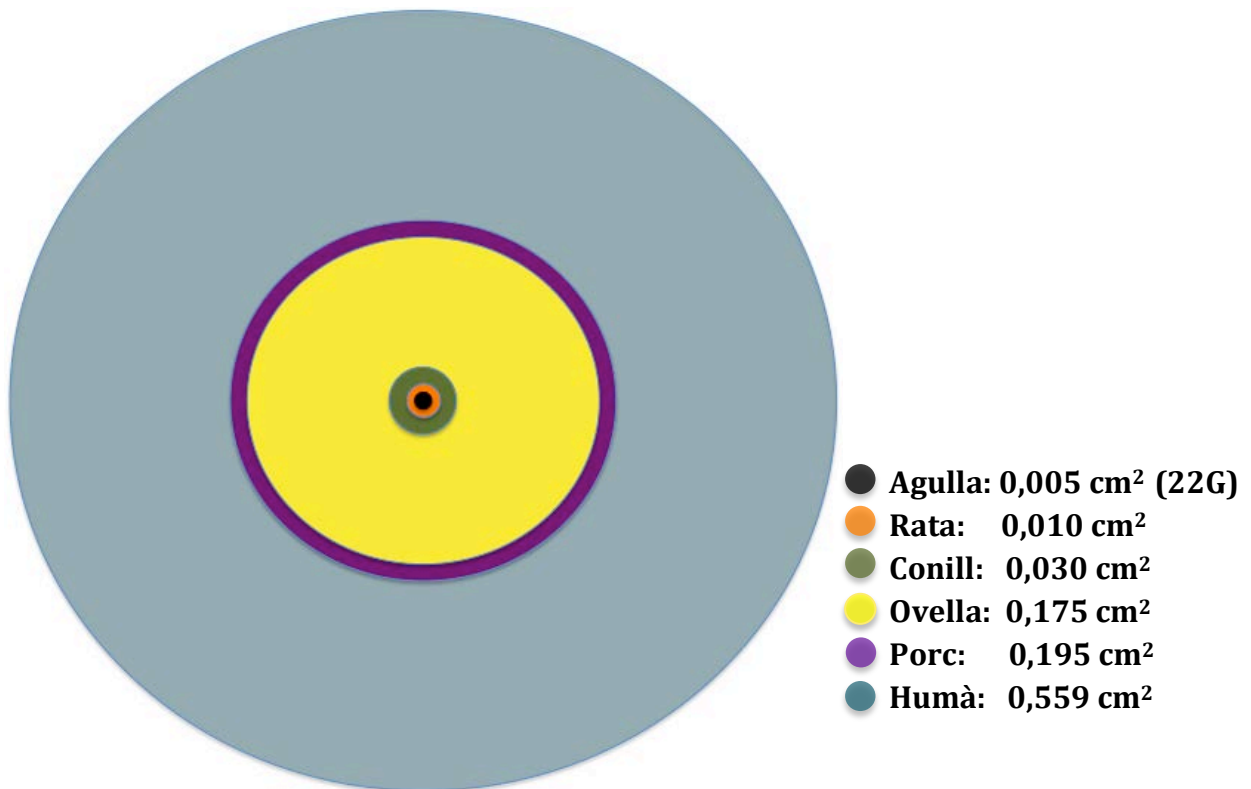


Figura 21. Representació de la relació de mides de nervi ciàtic i una agulla de pràctica clínica habitual en humà

*“Tienes que bailar como si nadie te estuviera viendo,
amar como si nunca te hubieran herido,
cantar como si nadie te estuviera escuchando
y vivir como si el cielo estuviera en la tierra”*

William W. Purkey.

Barcelona, Abril 2019.