

## La biopsia de nervio periférico

FERNANDA TEIXEIRA DE ARANDA\*

La biopsia de nervios periféricos ha sido realizada desde hace varios años. Sin embargo, en nuestro medio el hábito de la toma de nervio periférico no está difundido, a pesar de no existir impedimentos técnicos. La escisión de un segmento de nervio periférico es un procedimiento sencillo, que puede ser realizado por un residente de cirugía.

La fijación y el tratamiento para microscopía óptica y electrónica, pese a los cuidados que se describirán a continuación, no ofrecen dificultades y dan buenos resultados. La separación (*teasing*) de fibras nerviosas puede ser efectuada fácilmente por un técnico con un corto adiestramiento. Los estudios cuantitativos han sido simplificados bastante con la aparición de aparatos magnéticos que se encuentran a la venta en el mercado.

Sin embargo, la biopsia de nervio periférico no es un procedimiento inocuo, pues puede provocar déficit neurológico en mayor o menor grado. Por lo tanto, se deben tener ciertos cuidados en la elección y en el tratamiento del nervio, para obtener del material la mayor información posible y evitar al máximo los artificios que dificultan la interpretación de las lesiones.

Recibido: 29 de junio de 1983.

Aceptado: 7 de noviembre de 1983.

\* División de Patología. Unidad de Investigación Biomédica. Centro Médico Nacional. Instituto Mexicano del Seguro Social.

Dyck y Lofgren señalaron seis puntos a considerar antes de efectuarse la biopsia de un nervio.<sup>1</sup> Con base en ellos se establecieron los siguientes criterios:

1. El nervio en cuestión debe verse afectado por la enfermedad que presente el paciente, lo que puede ser detectado clínicamente por cambios tróficos de piel, atrofia muscular, alteraciones de la sensibilidad y disminución o ausencia de reflejos tendinosos.
2. Debe haber poca variación anatómica en el trayecto de este nervio y su acceso quirúrgico debe ser fácil.
3. El riesgo de lesión a estructuras adyacentes (vasos, tendones o articulaciones) debe ser mínimo.
4. Tamaño del segmento a obtener:
  - a) *Longitud*: Para una biopsia de rutina, tratada para microscopía óptica, microscopía electrónica y *teasing*, es suficiente un segmento de 2 cm. Si se planean estudios bioquímicos, lo ideal es obtener un segmento de 4 cm.
  - b) *Anchura*: En los casos de afección de la neurona o de la mielina, basta un solo fascículo del nervio. Cuando sea posible debe preferirse la biopsia fascicular a la biopsia total, pues provoca menor déficit neurológico. Sin embargo, en las enfermedades con lesiones en el epineuro, *v.gr.*, la poliarteritis nodosa, es indispensable practicar biopsia total.
5. Se debe evitar tomar nervios muy expuestos a traumas de la vida diaria, (*v.gr.* el nervio peroneo

común a la altura de la cabeza del peroné), para que las características de la entidad en estudio no se vean oscurecidas por alteraciones de otro origen.

6. Se debe contar con el patrón normal del nervio estudiado en diversas edades, en lo que respecta a espectros de diámetro axonal, espesor de la vaina de mielina o tamaño de espacios internodales. Esos patrones son útiles para comparación con el material patológico que esté siendo analizado.
7. El nervio elegido debe poder ser utilizado para estudios electrofisiológicos en vivo.

El nervio más comúnmente sometido a biopsia es el nervio safeno externo (sural de los anglosajones), a la altura del tobillo, pues llena los criterios mencionados. Es afectado con frecuencia en enfermedades neurológicas; tiene trayecto subcutáneo poco variable y largo, lo que permite la resección de grandes segmentos. La separación de sus fascículos es fácil y su localización, entre el tendón de Aquiles y el maléolo lateral, lo protege de traumas. Además, es un nervio bien documentado en lo que toca a valores normales para las diversas edades.<sup>2-4</sup> Sin embargo, este nervio es relativamente grande y no es razonable sacrificarlo en el caso de una biopsia total.

La técnica de biopsia del nervio safeno externo es sencilla y solamente requiere anestesia local. La incisión debe ser paralela al tendón de Aquiles, entre este y el maléolo lateral y debe extenderse por 6 a 8 cm proximalmente, a partir del maléolo. El nervio se encuentra sobre la fascia profunda, cerca de la vena safena.<sup>5</sup>

El nervio safeno externo solamente conduce fibras sensitivas y autonómicas. No es, por lo tanto, un buen nervio elegible en las afecciones motoras, como la esclerosis lateral amiotrófica. En esos casos se recomienda hacer una incisión longitudinal, cerca de la altura media de la pierna, en la cara posterior, donde está el nervio, arriba o abajo de la fascia y, tomar además del segmento del nervio, un fragmento de músculo estriado subyacente.<sup>6</sup> Si solamente se observan alteraciones en los nervios musculares, se ha de deducir que las fibras en degeneración son de origen motor.<sup>7</sup>

Una alternativa es efectuar la biopsia del nervio peroneo profundo; sin embargo, este nervio no solamente contiene fibras motoras sino también sensitivas. Además, es de localización muy profunda. Una ventaja es que su sección no induce problemas motores importantes, pues denervaría principalmente al extensor *digitorum brevis*.

Las alteraciones motoras son mejor estudiadas en la sala de autopsias, pues entonces hay posibilidad de tomar muestras de las raíces anteriores de los nervios espinales, constituidos puramente de fibras motoras.

Cuando el nervio safeno externo no pueda ser sometido a biopsia por problemas de cicatrización, como en casos de várices, enfermedad arterial o edema, hay que considerar otro nervio; el más

indicado es el radial superficial.<sup>8,9</sup> Pero en general se debe evitar practicar la biopsia de nervios del brazo, porque generalmente se ven menos afectados que los de la pierna y el déficit funcional iatrogénico es más notable.

Durante la biopsia importa tener presente los siguientes puntos:

- a) Pinzar o manipular el nervio solamente en sus extremidades con la mayor delicadeza posible. El maltrato del nervio puede volverlo inadecuado para el análisis (fig. 1).
- b) Mantener la irrigación al nervio tan intacta como sea posible.
- c) Remover en primer lugar las muestras destinadas a microscopía electrónica.
- d) No pinzar o usar cauterio en muestras elegidas para estudios electrofisiológicos.
- e) Remover toda la grasa para facilitar la fijación.

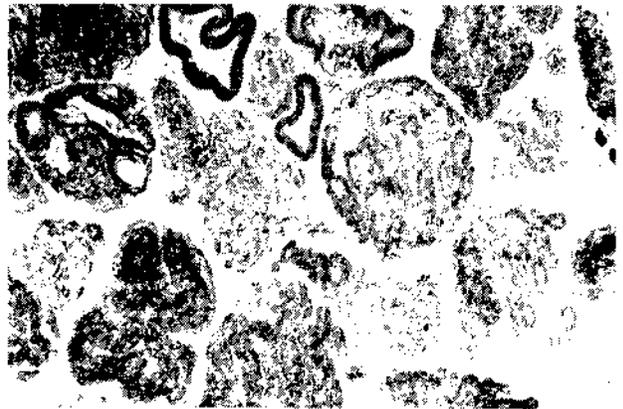


Fig. 1. Micrografía electrónica de un nervio safeno externo pinzado durante su extirpación. En la mayoría de las fibras es imposible reconocer el axón; las vainas de mielina están desintegradas. X 4 300.

Si con la realización de la biopsia se va a provocar una herida y un déficit en el paciente, lo menos que puede esperarse es que el nervio sea útil para el diagnóstico, para la investigación de la etiología o para dar base al tratamiento óptimo de la enfermedad. Es impropio, por lo tanto, limitarse a lanzar el nervio a un frasco con formol e incluirlo en parafina. Los métodos histológicos de rutina en el nervio periférico son útiles solamente en casos en que la lesión primaria no sea de la célula nerviosa, por ejemplo, en padecimientos inflamatorios, en las infiltraciones tumorales, o en los cambios vasculares. Pero si se quiere estudiar la célula nerviosa o la vaina de mielina, deben emplearse otros procedimientos.

El formol distorsiona de tal manera las estructuras nerviosas, que llega a impedir la interpretación de

alteraciones (fig. 2a y 2b). Uno de los mejores fijadores es el glutaraldehído. Ohnishi y col.,<sup>10</sup> en una serie de experimentos, demostraron que este aldehído preserva mejor los organelos intraaxonales cuando está preparado al 2 por ciento en amortiguador de cacodilato 0.1M, pH 7.4, a la temperatura ambiente, y sin la adición de cloruro de calcio.

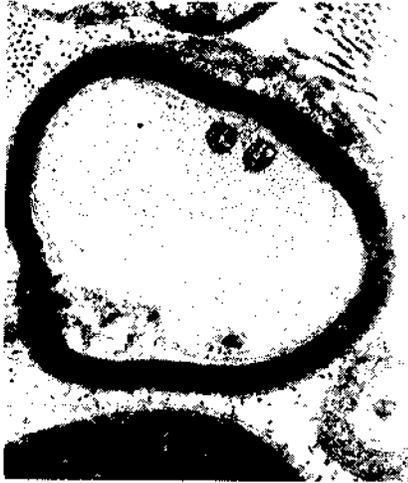


Fig. 2a. Micrografía electrónica de una fibra nerviosa fijada en glutaraldehído al 2% en amortiguador de cacodilato. La estructura de la vaina de mielina y del axón está perfectamente preservada. X 22 000.

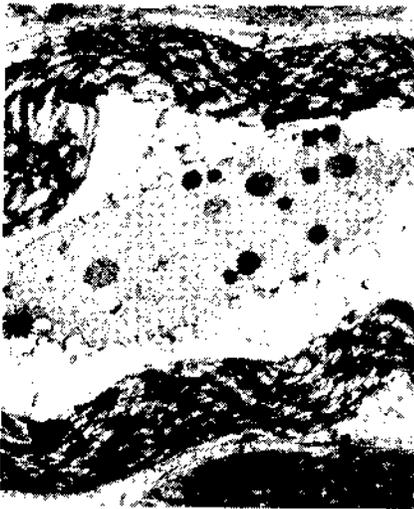


Fig. 2b. En contraste, la fibra fijada en formol presenta artificios graves, como la contracción del axón y su separación de la vaina de mielina. Esta última se encuentra también muy distorsionada. X 22 000.

Los mismos autores también demostraron<sup>11</sup> que la preservación de organelos empeora con el transcurso del tiempo entre la biopsia (o la muerte) y la fijación; diferencias en el número de microtúbulos fueron significativas a partir de seis horas de intervalo. Esos datos indican la importancia de la fijación temprana, principalmente en casos de autopsia. Si no se tiene acceso al glutaraldehído, un fijador también aceptable es el de Bouin, que preserva bien los detalles celulares. Tiene la desventaja, sin embargo, de endurecer el tejido y dificultar su corte si se prolonga la fijación por más de doce horas.

Una vez removido el nervio, debe ser estirado delicadamente sobre un pedazo de tarjeta y dejado sin fijar por aproximadamente 30 segundos, para que se adhiera (fig. 3). Después, nervio y tarjeta son



Fig. 3. El nervio debe ser adherido a una tarjeta antes de la fijación, para que no se retraiga.



Fig. 4. El nervio fijado sin estar previamente tendido, v.gr., sobre una tarjeta, se retrae, asumiendo aspecto en "acordeón". Glees. X 130.

sumergidos en fijador durante dos a cinco minutos. Esto impedirá que el nervio se retraiga y asuma aspecto de acordeón (fig. 4). Después de este tiempo el nervio es separado de la tarjeta y seccionado en cilindros de 1 cm de largo por 1 mm de diámetro o menos (fig. 5). En seguida se devuelven los segmentos al fijador durante un lapso de una y media a dos horas más, (fig. 6).



Fig. 5. Cuando el nervio ya está firme, es seccionado en cilindros finos.

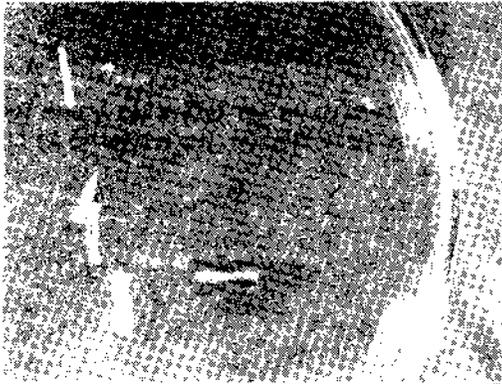


Fig. 6. La fijación debe extenderse por una y media a dos horas.

Terminando el tiempo de fijación, el fragmento es transferido al amortiguador, postfijado con tetróxido de osmio, impregnado e incluido en resinas plásticas, las cuales ya polimerizadas van a constituir un bloque firme. De este bloque serán cortadas secciones de 1 mm de espesor, las cuales serán teñidas con azul de toluidina o paragón y observadas al microscopio óptico.

El material así preparado permite al patólogo identificar detalles que no serían visibles en las preparaciones obtenidas de bloques de parafina. Por ejemplo, en la figura 7 se observa una sección de

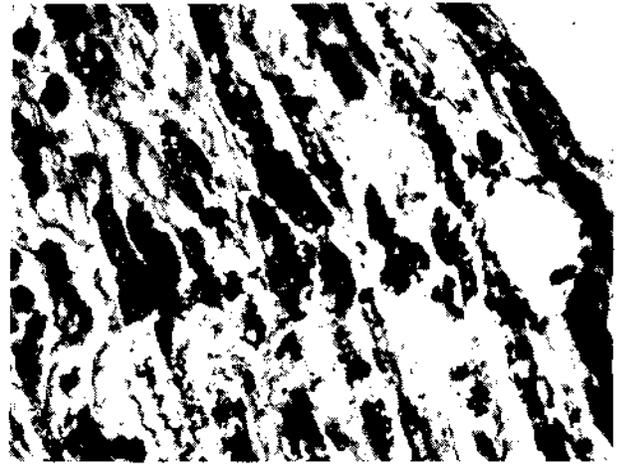


Fig. 7. Síndrome de Guillain-Barré. Las vainas de mielina se encuentran interrumpidas segmentariamente, sugiriendo que hay desmielinización. Luxol fast blue. X 280.

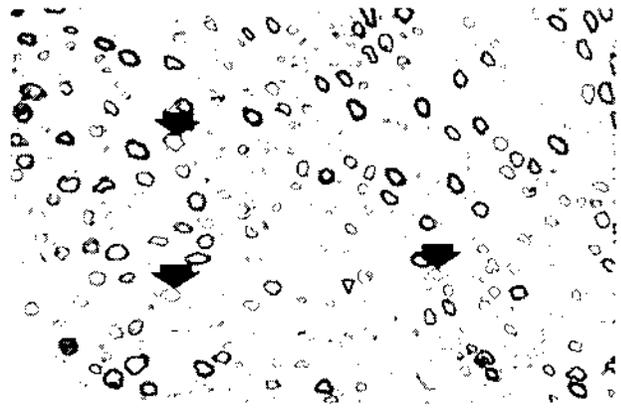


Fig. 8. Síndrome de Guillain-Barré. Hay varios axones normales, pero otros tienen la vaina de mielina muy fina, lo que indica remielinización (flechas). Algunos axones están completamente desmielinizados (cabeza de flecha).

un nervio incluido en parafina y teñido por el método Klüver-Barrera FEE para mielina.<sup>12</sup> Hay áreas del nervio que no se tiñen, que son interpretadas como focos de desmielinización. Sin embargo, una tracción excesiva del nervio puede producir la misma apariencia. Ya fijado el material en plástico (fig. 8) permite ver que hay axones desmielinizados y remielinizados, contiguos a otros de apariencia normal, y en el intersticio, macrófagos con restos de la mielina en el citoplasma.

Otra desventaja de la inclusión en parafina es que las muestras son tratadas con alcoholes y xilol, que son solventes de los lípidos, y después calentadas a 58°C, que es la temperatura de fusión de la parafina.

El nervio es muy sensible a este tratamiento y por lo tanto, presentará artificios. Por ejemplo, en secciones longitudinales de nervios incluidos en parafina, la mielina adquiere un aspecto clásico, en espina de pescado, que antiguamente se interpretaba como característica de la arquitectura de la mielina y de la llamada "neuroqueratina". Hoy se sabe que este aspecto es dado por la fijación e inclusión en parafina, que producen un artificio el cual, al microscopio electrónico de transmisión, aparece como áreas de desprendimiento dentro de la vaina de mielina.

*El uso del microscopio electrónico en las biopsias de nervio*

Hay un aforismo en patología de nervio periférico: *Si no se observan lesiones a nivel de microscopia óptica, será improbable que haya alteraciones ultraestructurales.* Esta regla no es absoluta, pero indica que la mayoría de los diagnósticos se pueden hacer solamente usando secciones de 1 µm. Hay, sin embargo, ocasiones en que el microscopio electrónico es indispensable.

Se da un ejemplo en la figura 9, en la cual se ve una sección de nervio incluido en parafina y tratado con el método de Marsland, Gleees y Erikson.<sup>13</sup> Los axones están teñidos de negro, tienen diámetro irregular y se interrumpen bruscamente. En esta sección es dudosa la degeneración de axones. La microscopia electrónica del mismo nervio ilustra que el axón, a pesar de estar completamente desmielinizado, conserva su estructura normal (fig. 10).

El microscopio electrónico también es indispensable para el estudio de fibras amielínicas, que son demasiado pequeñas para ser examinadas al micros-



Fig. 9. Síndrome de Guillain-Barré. En las tinciones de plata de secciones de nervios incluidos en parafina, los axones pueden aparecer interrumpidos (flechas), lo que podría ser interpretado erróneamente como degeneración axonal. Gleees. X 280.

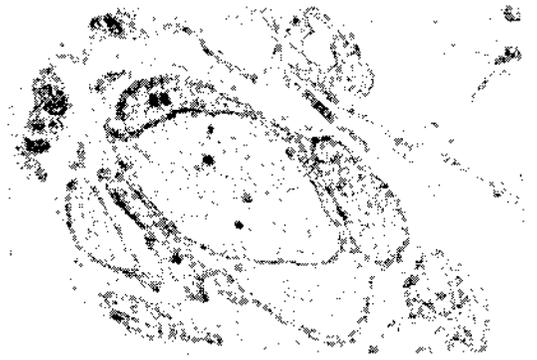


Fig. 10. Micrografía electrónica del mismo nervio de la fig. 9. El axón está completamente desmielinizado, pero no presenta signos de degeneración. X 11 000.

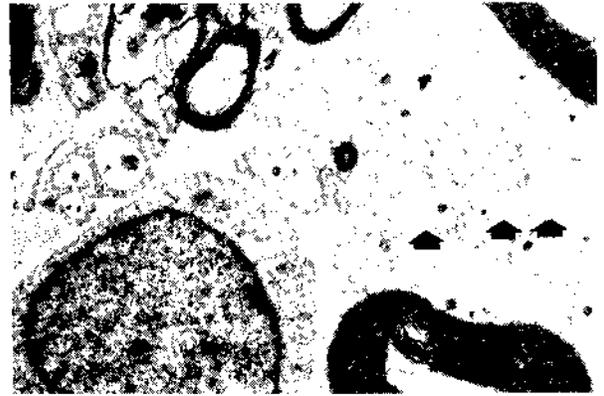


Fig. 11. Las fibras amielínicas son muy pequeñas (flechas) y son visibles solamente bajo microscopia electrónica. X 10 000.



Fig. 12. Rabia paralítica experimental. Se observa degeneración axonal incipiente. X 4 000.

copio óptico; las mayores fibras amielínicas apenas rebasan una micra de diámetro (fig. 11).

Alteraciones axonales iniciales, como las ejemplificadas en la figura 12, también sólo pueden ser vistas bajo el microscopio electrónico, el cual igualmente permite ver la presencia de agentes infecciosos de pequeño tamaño, como el virus de la rabia, y la presencia de cuerpos de inclusión, como en las enfermedades de depósito.

#### *Separación de fibras nerviosas (teasing)*

Otro método para el estudio de los nervios periféricos es la separación de fibras nerviosas, o *teasing*, término de aceptación internacional. En este procedimiento, el nervio es procesado como para microscopía electrónica. La diferencia es que cuando ya está impregnado de resina, no se le lleva a la estufa, sino que se le mantiene a  $-15^{\circ}\text{C}$ , con el objeto de retardar al máximo la polimerización. De este nervio, teñido de negro con osmio y en el medio viscoso de la resina, se separan fibras nerviosas individuales con microalfileres (fig. 13), bajo un microscopio de disección. Estas fibras son montadas con la misma resina sobre un porta objetos, y dejadas en una estufa a  $60^{\circ}\text{C}$ , por 24 horas para que se endurezca. Usando un microscopio óptico dotado de un micrómetro ocular, se miden el diámetro y el espacio internodal de la fibra y se observan las condiciones del axón y de la vaina de mielina (fig. 14). Se sabe que la longitud del espacio internodal normal varía directamente con el diámetro axonal; se puede, por lo tanto, mediante curvas de regresión, valorar la ocurrencia de desmielinización y de alteraciones axonales.

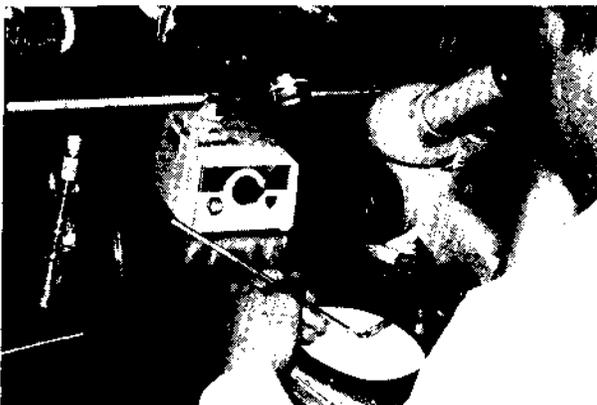


Fig. 13. La separación de fibras nerviosas (*teasing*) se hace sobre una laminilla con dos microalfileres, bajo un microscopio de disección.



Fig. 14. Fibra nerviosa aislada. La flecha indica un nodo de Ranvier. El segmento de espacio internodal a la izquierda está remielinizado y posee una vaina de mielina muy fina. El segmento a la derecha tiene una vaina de mielina de espesor normal, pero presenta desmielinización incipiente en la región paranodal (cabeza de la flecha). X 400.

En las fibras separadas se puede ver, como en las secciones de  $1\ \mu\text{m}$ , la ocurrencia de desmielinización, remielinización y degeneración del axón. Tiene, sin embargo, sobre las secciones de  $1\ \mu\text{m}$ , las ventajas de poder observar diversos segmentos de la misma fibra y conocer el mismo proceso a lo largo de la fibra. Eso es importante, por ejemplo, en los casos de desmielinización segmentaria. Otra ventaja es que gracias a ciertas características se puede determinar en una fibra regenerada, el proceso patológico pre-existente.

#### *Indicaciones de la biopsia de nervio periférico*

¿Cuándo está indicada la biopsia del nervio periférico y cuándo no? Esta es una pregunta de difícil respuesta, y la decisión debe ser tomada en cada caso en particular.

No son muchas las enfermedades que producen alteraciones morfológicas específicas en los nervios periféricos. Esta lista incluye las enfermedades de depósito, con sus características inclusiones, la amiloidosis y las enfermedades de la colágena, sobre todo la poliarteritis nodosa. Hay otras enfermedades que producen alteraciones características, pero no patognomónicas, que ayudan al diagnóstico clínico. Un ejemplo es la dilatación axonal con gran proliferación de neurofilamentos, que se observa en los casos de adicción a la inhalación de solventes orgánicos<sup>14</sup> y en la neuropatía axonal gigante, enfermedad hereditaria que afecta principalmente a niños.<sup>15</sup> Otro ejemplo es la formación en cáscara de cebolla, constituida por múltiples capas de células de Schwann alrededor de fibras que sufrieron recurrencias de

des y remielinización, como pasa en las enfermedades de Dejerine-Sottas, Charcot-Marie-Tooth y Refsum.<sup>16,17</sup>

Cuando el diagnóstico clínico ya está bien establecido, como en el caso de la diabetes, la biopsia del nervio añadirá poco en relación a la conducta a seguir con el paciente y además, le acrecentará las molestias que ya padece; no debe, por lo tanto, ser realizada, a menos que el caso en particular lo amerite, por presentar sintomatología clínicamente no explicable.

En la sala de autopsias, el enfoque es diferente: existe la posibilidad de representar histológicamente varios nervios, que serían, de otra manera, inaccesibles. La toma de nervios en autopsias debe ser defendida, pues la investigación en este campo llevará a mejores métodos de diagnóstico y tratamiento.

12. Klüver, H. y Barrera, E.: *A method for the combined staining of cells and fibres in the nervous system*. J. Neuropathol. Exp. Neurol. 12:400, 1953.
13. Marsland, T.A.; Glees, P. y Erikson, L.B.: *Modification of the glee silver impregnation for paraffin sections*. J. Neuropathol. Exp. Neurol. 13: 587, 1954.
14. Korobkin, R.; Asbury, A.K.; Summer, A.J. y Nielsen, S.L.: *Glue sniffing neuropathy*. Arch. Neurol. 32: 158, 1975.
15. Prineas, J.W.; Ouvrier, R.A.; Wright, R.G.; Walsh, J.C. y Mc.Leod, J.G.: *Giant axonal neuropathy. A generalized disorder of cytoplasmic microfilament formation*. J. Neuropathol. Exp. Neurol. 35: 458, 1976.
16. Dyck, P.J.; Ellefson, R.D.; Lais, A.C.; Smith, R.C.; Taylor W.F. y Van Dyke, R.A.: *Histologic and lipid studies of sural nerves in inherited hypertrophic neuropathy: preliminary report of a lipid abnormality in nerve and liver in Dejerine-Sottas disease*. Mayo Clin. Proc. 45: 286, 1970.
17. Fardeau, M.; Abelanet, R.; Laudat, P.H. y Bonduelle, M.: *Maladie de Refsum. Etude histologique, ultrastructurale et biochimique d'une biopsie de nerf périphérique*. Rev. Neurol. (Paris) 122: 185, 1970.

## REFERENCIAS

1. Dyck, P.J. y Lofgren, E.P.: *Method of fascicular biopsy of human peripheral nerve for electrophysiologic and histologic study*. Mayo Clin. Proc. 41: 778, 1966.
2. Ochoa, J. y Mair, W.G.: *The normal sural nerve in man. I-Ultrastructure and numbers of fibers and cells*. Acta Neuropathol. (Berlín) 13: 197, 1969.
3. Gutrecht, J.A. y Dyck, P.J.: *Quantitative teased-fiber and histological studies of human sural nerve during postnatal development*. J. Comp. Neurol. 138: 117, 1970.
4. Dyck, P.J.; Schultz, P.W. y Lais, A.C.: *Mensuration and histological typing of teased myelinated fibers of healthy sural nerve in man*. En: *Clinical studies in myology*. Kakulas, B.K. (Ed.) Int. Cong. Series. Amsterdam, Excerpta Médica. 1973.
5. Asbury, A.K. y Connolly, E.S.: *Sural nerve biopsy. Technical note*. J. Neurosurg. 38: 391, 1973.
6. Moss, J.P.; Meckler, R.J. y Moss, W.E.: *Consistent effective technique for muscle and nerve biopsy*. Am. J. Surg. 138: 736, 1979.
7. Stevens, J.C.; Lofgren, E.P. y Dyck, P.J.: *Biopsy of peripheral nerves*. En: *Peripheral neuropathy*. Dyck, P.J.; Thomas, P.K. y Lambert, E.H. (Eds.). Filadelfia, W.B. Saunders Co. 1975, vol. 1, p. 410.
8. O'Sullivan, D.J. y Swallow, M.: *The fibre size and content of the radial and sural nerves*. J. Neurol. Neurosurg. Psychiat. 31: 464, 1968.
9. Tsairis, P.; Dyck, P.J. y Mulder, D.W.: *Natural history of brachial plexus neuropathy*. Arch. Neurol. 27: 109, 1972.
10. Ohnishi, A.; O'Brien, P.C. y Dyck, P.J.: *Studies to improve fixation of human nerves. V. Effect of temperature, fixative and CaCl<sub>2</sub> on density of microtubules and neurofilaments*. J. Neuropathol. Exp. Neurol. 35: 167, 1976.
11. Ohnishi, A.; O'Brien, P.C. y Dyck, P.J.: *Studies to improve fixation of human nerves. IV. Effect of time elapsed between death and glutaraldehyde fixation on density of microtubules and neurofilaments*. J. Neuropathol. Exp. Neurol. 35: 26, 1976.

## AGRADECIMIENTOS

Deseo agradecer a los doctores Bruno Estañol Vidal y Amador González Angulo por sus útiles críticas al manuscrito, a la señora Guillermina Sánchez Ríos por su excelente trabajo fotográfico y a la señorita Alicia Velasco Monterrubio, por su dedicación al mecanografiar este trabajo.