

# Modulación del Colágeno Tipo I y III por Ácido Láctico en la Remodelación del Nervio Isquiático tras Lesión por Compresión: Análisis Histoquímico con Rojo Sirio en Ratas Sprague-Dawley

Modulation of Types I and III Collagen by Lactic Acid in Sciatic Nerve Remodeling after Compression Injury: Histochemical Analysis with Sirius Red in Sprague-Dawley Rats

Natalia Labraña-Ojeda<sup>1</sup>; Camila Isla-Medina<sup>2</sup>; Nicolás Vidal-Seguel<sup>3</sup> & Enrique Montiel-Eulefi<sup>4</sup>

LABRAÑA-OJEDA, N.; ISLA-MEDINA, C.; VIDAL-SEGUEL, N. & MONTIEL-EULEFI, E. Modulación del colágeno tipo I y III por ácido láctico en la remodelación del nervio isquiático tras lesión por compresión: Análisis histoquímico con rojo sirio en ratas Sprague-Dawley. *Int. J. Morphol.*, 43(4):1337-1343, 2025.

**RESUMEN:** El nervio isquiático (NI) tras una lesión por compresión comienza con un proceso de regeneración o fibrosis producto de una inflamación desregulada. El ácido láctico (AL), ha demostrado modular la respuesta inflamatoria en el nervio periférico (NP) promoviendo el cambio de fenotipo de macrófagos a antiinflamatorio. Los macrófagos tienen un papel fundamental en el proceso de degeneración Walleriana pues eliminan desechos celulares y degradan el colágeno en la zona dañada, en un fenómeno de aclaramiento, previo a la remodelación de la zona dañada del nervio. El colágeno, que constituye casi la mitad de las proteínas del nervio, tiene un papel dual en la regeneración, mientras que el colágeno I inhibe el crecimiento axonal y favorece la fibrosis, el colágeno III se asocia con la supervivencia celular y procesos regenerativos. Este estudio analiza la expresión de colágeno I y III, en la remodelación del NI a siete días post-lesión, mediante tinción con rojo sirio (RS) en NI de ratas Sprague Dawley, sometidos a compresión (15 kg/10 min) y tratados con inyección intraneural de AL. La cuantificación del colágeno se realizó mediante análisis de imágenes de la tinción de cortes histológicos con RS. Los resultados demostraron que la inyección intraneural AL reduce el colágeno total y aumenta el colágeno III a los siete días, sugiriendo que el AL no solo disminuye la fibrosis, sino que también promueve un ambiente regenerativo mediante la inducción de colágeno III. Esta investigación aporta nuevos conocimientos sobre el papel del AL en la terapia regenerativa de lesiones nerviosas.

**PALABRAS CLAVE:** Colágeno Tipo I; Colágeno Tipo III; Lesiones de Nervio Periférico; Nervio Isquiático; Ácido Láctico.

## INTRODUCCIÓN

El sistema nervioso periférico es altamente susceptible a tensiones mecánicas, especialmente a la compresión derivada de la función y exposición a las actividades cotidianas (Rosso *et al.*, 2014). Entre los nervios más afectados se encuentra el nervio isquiático (NI), que forma parte de los cinco pares de nervios espinales lumbares sacros y es el tercero con mayor incidencia de lesiones traumáticas del miembro inferior (Aman *et al.*, 2022). Estas lesiones representan una carga clínica significativa, con una incidencia anual de 1 por cada 1000 individuos, afectando principalmente a hombres en edad laboral, entre 20 y 60 años, además, generan un impacto económico considerable, con costos de atención médica que alcanzan los \$150 mil

millones de dólares anuales en Estados Unidos (Grinsell & Keating, 2014; Aman *et al.*, 2022). Aunque los nervios periféricos (NP) poseen capacidad de regeneración, este proceso se distingue por una tasa de recuperación axonal lenta y una rehabilitación funcional limitada, lo que conduce a un deterioro de la función nerviosa (Yu *et al.*, 2023). Este fenómeno se agrava debido a la inflamación postraumática y al estrés oxidativo, factores que inhiben la recuperación funcional del nervio (Hsu *et al.*, 2004). La regeneración de los NP sigue una serie de etapas secuenciales que incluyen la inflamación, aclaramiento de remanentes celulares en un proceso denominado degeneración Walleriana (DW), remodelación y regeneración o fibrosis (Gaudet *et al.*, 2011).

<sup>1</sup> Programa de Magíster en Ciencias mención Biología de la Reproducción, Centro de Biotecnología en Reproducción (CEBIOR), Universidad de La Frontera, Temuco, Chile.

<sup>2</sup> Carrera de Biotecnología, Facultad de Ciencias Agropecuarias y de Medio Ambiente. Universidad de La Frontera, Temuco, Chile.

<sup>3</sup> Doctorado en Ciencias Morfológicas/Departamento de Ciencias Básicas, Facultad de Medicina. Universidad de La Frontera, Temuco, Chile.

<sup>4</sup> Laboratorio de Biomedicina, Departamento de Ciencias Básicas/CEBIOR, Facultad de Medicina. Universidad de La Frontera, Temuco, Chile. FUNDED. Este trabajo fue financiado por la Universidad de La Frontera, Temuco, Chile, DIUFRO, proyecto DI16-0130.

Sin embargo, cuando la inflamación persiste más allá del período necesario para iniciar la regeneración, se produce una desregulación del proceso, lo que favorece la formación de fibrosis. Por ello, la modulación de la inflamación podría optimizar la respuesta regenerativa, reduciendo la fibrosis y promoviendo una recuperación funcional más efectiva (Baradaran *et al.*, 2021).

El ácido láctico (AL) ha sido reconocido como un modulador del proceso inflamatorio (Hoque *et al.*, 2014; Vidal-Seguel & Montiel-Eulefi, 2019). Además, se ha observado que puede influir en la especificación de genes embrionarios neurales y en la activación y proliferación de células madre perivasculares (Herrera-Bravo *et al.*, 2013). Sin embargo, su papel en la regeneración de los NP ha sido poco explorado. El AL, además de su función en el metabolismo celular, está implicado en el desarrollo de los NP durante la embriogénesis. Durante este proceso, las células de la cresta neural, que dan origen a las neuronas sensoriales, y las fibras motoras, que se derivan de células progenitoras en las astas anteriores de la médula espinal, requieren grandes cantidades de energía para llevar a cabo procesos como la proliferación, migración y diferenciación. El AL, producto de la glucólisis anaeróbica, actúa como una fuente de energía alternativa a la glucosa, particularmente en condiciones de baja disponibilidad de oxígeno y nutrientes (Magistretti & Allaman, 2018). Estudios recientes han demostrado que el AL también puede modular la migración celular al funcionar como una molécula de señalización que influye en vías clave, como el factor inducible por hipoxia HIF-1 $\alpha$ , que regula la respuesta celular en condiciones de hipoxia, y MAPK, implicada en la remodelación del citoesqueleto y la motilidad celular (Zheng *et al.*, 2016).

El colágeno desempeña un papel crucial al proporcionar un microambiente óptimo que favorece el crecimiento, la proliferación y la migración de las células de Schwann (CS), mejorando así la regeneración y la recuperación funcional de los NP tras una lesión (Li *et al.*, 2022). Los colágenos tipo I y III constituyen el 49 % de las proteínas presentes en los NP, siendo el tipo I el más abundante (Deal *et al.*, 2012). El colágeno I, es reconocido como el principal componente en tejidos y órganos (Li *et al.*, 2022). Tras una lesión, los fibroblastos endoneurales sintetizan colágeno tipo I, el cual brinda soporte estructural para el crecimiento y la regeneración axonal, promoviendo la migración alineada de axones y CS (Koopmans *et al.*, 2009; Li *et al.*, 2022). El colágeno I también se ha relacionado con la formación de cicatrices fibróticas, lo que puede interferir en la regeneración nerviosa, en cambio, se ha reportado que el colágeno III incrementa la supervivencia de las células astrogiales y neuronas en la médula espinal (Bi *et al.*, 2024).

La tinción de tejidos con rojo sirio (RS) combinada con su análisis mediante microscopía de luz polarizada, permite la visualización entre colágeno tipo I y tipo III. El colágeno tipo I, caracterizado por su mayor grosor, se identifica morfológicamente como fibras que exhiben una birrefringencia amarilla a rojo intenso, mientras que el colágeno tipo III, de estructura más delgada, se distingue por presentar un tono verde pálido (Kaemmer *et al.*, 2010). En la actualidad, el RS se ha consolidado como una herramienta para la cuantificación del contenido de colágeno I y III (Lin-Hui *et al.*, 2024), proporcionando datos esenciales sobre la proporción entre estos dos tipos de colágeno y evaluar la estabilidad tisular, así como para elucidar los mecanismos de remodelación del NP (Kaemmer *et al.*, 2010).

El creciente interés en el papel del AL como modulador de la respuesta inflamatoria, particularmente en la regulación de la proporción celular durante la fase inflamatoria temprana tras una lesión por compresión del NI en ratas (Vidal-Seguel & Montiel-Eulefi, 2019), fomenta esta investigación de sus efectos sobre la remodelación del NP. Este estudio se centra en evaluar el impacto del AL, administrado mediante inyección intraneural en los NI de ratas Sprague Dawley, sobre la expresión de colágeno tipo I y III a siete días post-lesión, con el objetivo de elucidar su influencia en los mecanismos de reparación y regeneración del NI.

## MATERIAL Y MÉTODO

**Animales.** Este trabajo fue autorizado por el Comité Ético Científico de la Universidad de La Frontera, Temuco, Chile (N° de folio del proyecto UFRO: 64/24). Se utilizaron como animales de experimentación 15 ratas Sprague Dawley machos y con peso promedio de 250-300 g, agrupados aleatoriamente en 3 grupos de compresión nerviosa de 5 animales cada uno: 1) grupo control (GC) 2) grupo control negativo con placebo (100  $\mu$ L PBS) (GCPBS) y 3) grupo experimental con inyección intraneural única de 100  $\mu$ L de AL [20mM] (GEAL) para los tratamientos de a siete días. Los animales fueron aportados por el Bioterio de la Universidad de La Frontera, Temuco, Chile.

Los animales fueron alojados en jaulas individuales de policarbonato, en ambiente controlado con ciclos diarios de 12 h de luz/oscuridad, temperatura ambiente de 22 °C, con alimento (Champion, Chile) y agua potable *ad libitum*.

Previo al protocolo quirúrgico los animales fueron anestesiados con Isoflurano por vía inhalatoria con equipo de anestesia, 5-8 % para la inducción y a 1-3 % para el mantenimiento en la intervención quirúrgica. Como método de analgesia cada animal fue tratado durante 7 días con paracetamol recomendado para ratas, en una dosis de 200 mg/

kg p.o. Además de Buprenorfina administrado vía subcutánea, en dosis de 0,1 mg/kg por los 7 días post operatorio, según lo establecido por el manual de Aspectos Bioéticos de la experimentación animal de FONDECYT-CONICYT (Comité Asesor de Bioética Fondecyt-Conicyt, 2009).

**Protocolo quirúrgico.** El acercamiento quirúrgico se inició con la asepsia de la zona de abordaje y ubicación del animal sobre un campo estéril en posición decúbito lateral. Se realizó una incisión con un bisturí N° 24 sobre la cara posterolateral del muslo izquierdo paralelo a la cresta iliaca de ~1 cm. Se diseccionó de superficial a profundo, la piel, fascia superficial, fascia profunda y finalmente la musculatura entre los músculos glúteo máximo y bíceps femoral. La separación de los vientres musculares y fascias se llevó a cabo con una tijera de disección, mientras que la exposición del NI se realizó con una pinza anatómica. Los animales se posicionaron sobre una máquina construida de acero inoxidable capaz de inducir daño nervioso por medio de un peso controlado. Se aplicó sobre el NI izquierdo una carga de 15 kg durante 10 min con un área de trituración circular ~0,2826 cm<sup>2</sup> (Ø 0,6 cm, 5.2 MPa, 53.07 kgf / cm<sup>2</sup>) (Schiaveto de Souza *et al.*, 2004). Los grupos GCPBS y GEAL fueron sometidos a una inyección intraneural en el sitio de lesión, en dosis única de 100 µL de PBS y de 100 µL AL [20 mM], respectivamente. La inyección intraneural fue realizada inmediatamente posterior a la lesión según lo descrito por Kim *et al.* (2018). Tras la lesión el NI se reposicionó en su lugar habitual, la incisión fue cerrada por planos y la piel cerrada con sutura de nylon 4-0 y tratada con povidona yodada. Durante los siete días post operatorio los animales fueron tratados con Buprenorfina vía subcutánea, en dosis de 0,1 mg/kg, c/12 h.

**Recolección y procesamiento de las muestras.** Los animales se sacrificaron séptimo día post operatorio en una cámara de dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>) con regulador prefijado a 5 psi, seguido de la disección y recolección del tejido. Las muestras de 10 mm de NI fueron inmersas en paraformaldehído al 4 % 0,1M pH 7,4 por dos horas a temperatura ambiente y luego a 4 °C por tres días. La deshidratación se realizó en una batería creciente de etanol y xilol. La inclusión fue realizada con parafina Paraplast plus® y los tacos se tallaron con los nervios orientados de tal manera de obtener cortes longitudinales. De cada taco se realizaron cortes seriados de 5 µm, los que se montaron en portaobjetos tratados previamente con silano (2 %) y los cortes histológicos se tiñen con RS al 1 %.

**Análisis de imágenes para la estimación de colágeno.** Las imágenes de los cortes histológicos de la zona comprimida de NI se obtuvieron mediante un microscopio Leica DM750 con monocromador y cámara integrada Leica ICC50 HD y

la captura de imagen se realizó con el programa Leica LAS EZ v3.3 para Windows.

**Cuantificación de colágeno con RS.** La estimación de la cantidad de colágeno total con RS se realizó a través del análisis de imagen con el programa Fiji- ImageJ según Baidoo *et al.* (2022). Para lo cual, la imagen es convertida a 8 bit para trabajar en escala de grises. Se seleccionó la imagen y se trabajó con selección automática de color rojo de luz transmitida y se cuantificó el promedio de la intensidad de color, que se refiere a la medición de la intensidad promedio de los píxeles dentro de la imagen a cuantificar (Schindelin *et al.*, 2012).

**Cuantificación de colágeno I y III.** La tinción RS de los cortes histológicos de NI fueron observadas bajo el microscopio óptico con monocromador lo que permitió revelar la birrefringencia roja/verde con luz polarizada del colágeno. Este método permite observar la diferenciación del colágeno tipo I (naranja-amarillo a naranja y rojo) y tipo III (verde-amarillo). La toma de fotografías fue realizada mediante la cámara integrada del microscopio Leica DM750. Se determinó la ubicación de la zona comprimida de los grupos de trabajo y se tomaron imágenes dentro del límite, con una resolución de 2048x1536 píxeles. Por cada sección, se tomaron 6 fotografías de 3 placas distintas por cada grupo de experimentación.

Las imágenes obtenidas, fueron analizadas con el programa FIJI-ImageJ (Baidoo *et al.*, 2022). Primero se realizó una deconvolución del color de la imagen en donde se abrió una ventana que permitió manipular el umbral de matiz, brillo y saturación. En este caso se modificó la opción de matiz "Hue" estableciendo un rango de 0-20 para la cuantificación del promedio de la intensidad de color rojo para el colágeno I y 50-120 para el color verde de colágeno tipo III.

**Análisis estadístico.** El análisis estadístico entre los tres grupos, se realizó mediante el test de ANOVA con un análisis Tukey HSD Post-hoc, utilizando el programa Minitab (USA) 19 versión 19.1, año 2020 (www.minitab.com). Un valor de p<0,05 se consideró estadísticamente significativo.

## RESULTADOS

Los NI de los tres grupos de estudio se disecaron después de siete días de la compresión y de los tratamientos con vehículo (PBS) o con AL, inyectados intraneuralmente en dosis única. Las zonas comprimidas fueron analizadas mediante la tinción con RS que expone la presencia de colágeno I y III al ser observado con luz polarizada, las imágenes se estudiaron mediante un programa informático para análisis de imágenes.

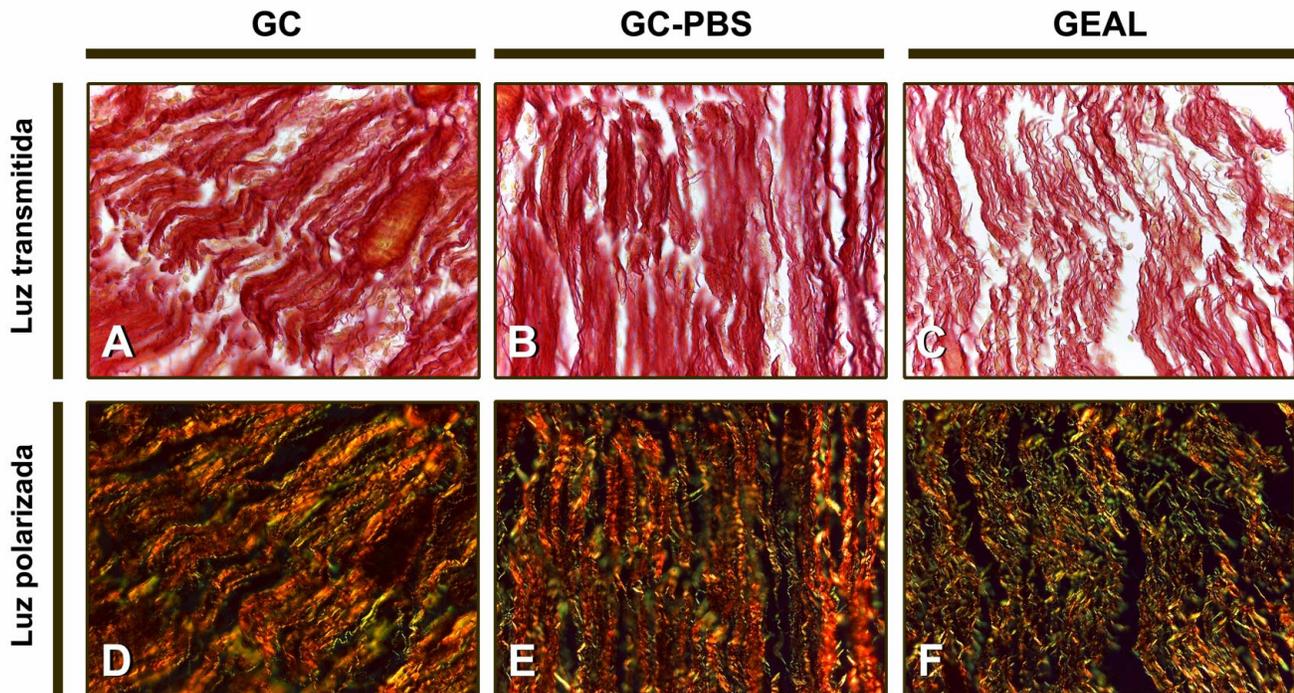


Fig. 1. Las microfotografías de las áreas lesionadas por compresión del NI de rata a siete días pos tratamiento de inyección intraneural de AL muestran el colágeno total teñido con RS (A-C) en las imágenes superiores y en las imágenes inferiores se presenta las respectivas regiones visualizadas bajo luz polarizada, revelando el colágeno I (rojo) y el colágeno III (verde) (D-F) (400x).

La tinción con RS en los cortes histológicos de los nervios lesionados permitió identificar la zona comprimida y visualizar el colágeno total (Fig. 1A-C). El análisis de imágenes en escala de grises, basado en la intensidad del color, cuantifica el colágeno total en la región comprimida entre los distintos grupos experimentales (Fig. 2). Los resultados muestran que el grupo tratado con AL (GEAL) presentaba una disminución significativa en la intensidad promedio de colágeno total a los siete días en comparación con el grupo control, lo que sugiere un efecto modulador del AL sobre la deposición de colágeno en el área lesionada.

El análisis de los cortes histológicos teñidos con RS mediante microscopía de luz polarizada equipada con monocromador permitió la visualización y diferenciación de los colágenos tipo I y tipo III (Fig. 1D-F). La cuantificación mediante análisis de imágenes digitales mostró que el colágeno tipo I, no se detectó diferencias significativas en su expresión entre los tres grupos experimentales (Fig. 3). Por otro lado, el colágeno tipo III, en el grupo tratado con AL (GEAL) presentó un incremento significativo ( $p < 0.05$ ) en la expresión de colágeno tipo III a los siete días post-tratamiento en comparación con ambos grupos control: GC (control no tratado) y GC-PBS (control con vehículo) (Fig. 4). Estos resultados sugieren que el tratamiento con AL induce cambios en la composición de la matriz extracelular, específicamente promoviendo la expresión de colágeno tipo III sin afectar los niveles de colágeno tipo I.

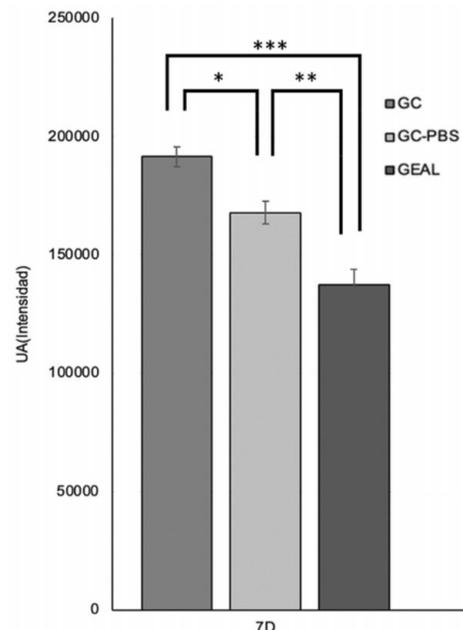


Fig. 2. Colágeno total a los siete días post tratamiento de inyección intraneural de AL. El gráfico muestra el promedio de intensidad de la tinción con RS en la zona comprimida para los tres grupos de estudio: GC, GC-PBS y GEAL, evaluados a los siete días (7D) post tratamiento de inyección intraneural de AL. Se muestra el error estándar de la media, las diferencias significativas se marcan con asteriscos: \* ( $p < 0,05$ ), \*\* ( $p < 0,005$ ), \*\*\* ( $p < 0,0005$ ).

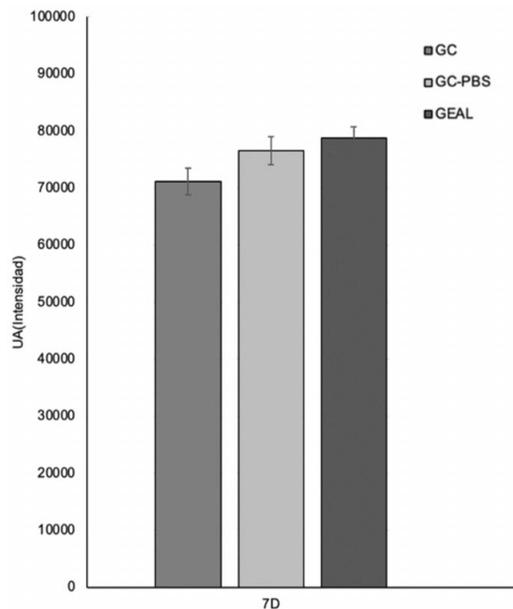


Fig. 3. Colágeno I a siete días post tratamiento de inyección intraneural de AL. El gráfico muestra la comparación del promedio de intensidad de colágeno I en la zona comprimida, a los siete días (7D) de tratamiento para los tres grupos de estudio GC, GC-PBS y GEAL. Los resultados se obtuvieron mediante la tinción de RS con luz polarizada, específica y el análisis de imágenes para color rojo asociada a la presencia de colágeno I. Se muestra el error estándar de la media.

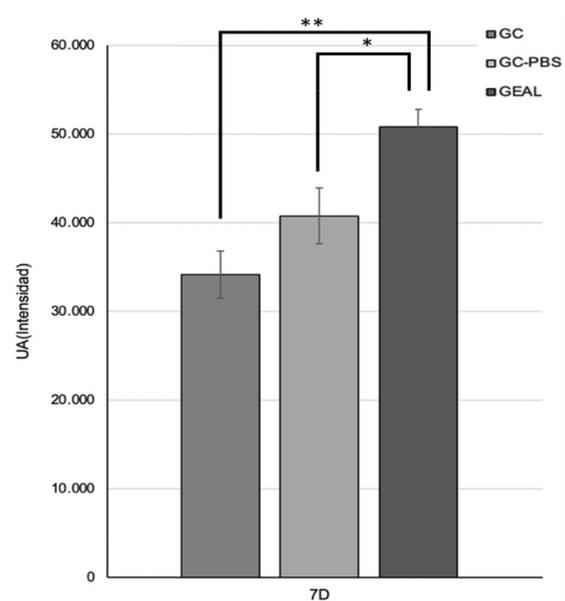


Fig. 4. Colágeno III a siete días post tratamiento de inyección intraneural de AL. El gráfico muestra la comparación del promedio de intensidad de colágeno III en la zona comprimida, a los siete días (7D) de tratamiento para los tres grupos de estudio GC, GC-PBS y GEAL. Los resultados se obtuvieron mediante el análisis de imágenes de la tinción de RS con luz polarizada, específica para color verde asociada a la presencia de colágeno III. Se muestra el error estándar de la media. Las diferencias significativas se marcan con asteriscos: \* ( $p < 0,05$ ) y \*\* ( $p < 0,005$ ).

## DISCUSIÓN

El daño por compresión del NI, clasificado y estudiado como axonotmesis, se regenera a través de una serie de etapas que incluyen la inflamación, aclaramiento de remanentes celulares en un proceso denominado degeneración Walleriana (DW), remodelación y regeneración o fibrosis (Gaudet *et al.*, 2011). El grado de fibrosis influye significativamente en las opciones terapéuticas disponibles para las lesiones de los NP, lo que subraya la importancia de identificar y cuantificar la distribución del colágeno, que depositado en exceso, dificulta una recuperación satisfactoria y funcional, ya que, genera factores que inhiben la regeneración axonal y dificultan el crecimiento de los axones tras la lesión, lo que se manifiesta en la obstrucción de los tubos endoneurales y la desorganización de las bandas de Büngner, estructuras críticas para la regeneración nerviosa (Kaemmer *et al.*, 2010). La inflamación es un proceso fundamental en la regeneración nerviosa, iniciándose con la desintegración axonal en el muñón distal del nervio. Este evento provoca la permeabilización de la barrera hematonerviosa y activa tanto las CS adyacentes, como los macrófagos residentes a través de receptores sensibles al daño tisular (Gaudet *et al.*, 2011). El manejo adecuado de la respuesta inflamatoria en lesiones

de NP ha adquirido un interés creciente en la actualidad, destacándose como un área prometedora para el desarrollo de estrategias terapéuticas que favorezcan la regeneración y minimicen la formación de tejido fibroso, dada su influencia crítica en el proceso de reparación nerviosa.

El AL se ha descrito como un modulador del proceso inflamatorio aumentando la cantidad de macrófagos en el sitio de lesión en el NP (Vidal-Seguel & Montiel-Eulefi, 2019), además el AL cumple un rol importante en la diferenciación del sistema nervioso asociado a la hipoxia y especificación neuronal, siendo una fuente nutricional para los nervios (Magistretti & Allaman, 2018). También, el AL desempeña un papel fundamental en la diferenciación embrionaria del sistema nervioso, particularmente en contextos asociados a la hipoxia y en la especificación neuronal, actuando como una fuente nutricional esencial para los nervios (Magistretti & Allaman, 2018). Su participación en estos procesos subraya su importancia no solo en la respuesta inflamatoria, sino también en la regulación del desarrollo y mantenimiento del tejido nervioso. El efecto del AL, inyectado en NP, sobre la supervivencia celular es motivo de futuros estudios. El AL, además, ha sido reportado

como capaz de estimular la polarización de macrófagos M1 descritos como proinflamatorio y M2 como antiinflamatorios (Li *et al.*, 2022) a través de la estimulación de los receptores de AL (GPR81) recientemente descritos en los últimos diez años (Colegio *et al.*, 2014; Hoque *et al.*, 2014).

Este trabajo ha podido comprobar que el colágeno total disminuye en la región comprimida, tanto con la punción de la inyección de vehículo y principalmente con AL, mostrando diferencias significativas a los siete días de tratamiento, lo que representa un mayor aclaramiento, posiblemente producido por el aumento de macrófagos previamente descrito (Vidal-Seguel & Montiel-Eulefi, 2019). La punción puede influir en la entrada de macrófagos al sitio de lesión, dado que, la inyección al penetrar el nervio, rompe las barreras que separan a las células sanguíneas y los componentes endoneurales. Es por esto, que el reclutamiento de macrófagos produce el aclaramiento tras la lesión por compresión, aumentada con la inyección de vehículo y más significativamente por la acción del AL.

El efecto de la inyección única de AL a una semana sobre el colágeno, señala que está principalmente ligado a su función de señalización más que a su papel de sustrato energético. La reducción del colágeno total en el nervio tratado con AL plantea un efecto sobre el proceso de fibrosis, uno de los aspectos de mayor interés, dado que la cicatriz fibrosa, ha sido reconocida por constituir una barrera altamente repulsiva para la regeneración de axones, tras la lesión de la médula espinal (Bi *et al.*, 2024).

El colágeno constituye la mitad de las proteínas de la matriz extracelular en el NP, correspondiendo principalmente a los colágenos tipo I y III (Deal *et al.*, 2012). El colágeno I ha sido reportado en la generación de la fibrosis, inhibiendo el crecimiento axonal mientras que, el colágeno III participa en la regeneración nerviosa (Bi *et al.*, 2024). Sorprendentemente, el AL desencadena una serie de eventos a siete días de tratamiento durante la etapa de remodelación del NI dañado, aumentando el colágeno III, el cual se ha asociado al incremento de la supervivencia de las células astrogiales y regeneración neuronal (Bi *et al.*, 2024). Esta situación, unida al aumento de colágeno III, plantea que se estaría presencia de una remodelación el NP, asociado principalmente a la función antiinflamatoria del AL. Aun así, el AL no es suficiente para producir el aumento del crecimiento axonal a los siete días, por lo que este proceso podría estimularse adicionando factores neurotróficos como NGF y BDNF (Cao *et al.*, 2013; Li *et al.*, 2022). Esto plantea que la remodelación inducida por el AL y la inyección afecta a otros colágenos, reduciendo el proceso fibrótico y que el AL potenciaría un ambiente más regenerativo asociado al aumento colágeno III a una semana de tratamiento.

El colágeno I a siete días, presenta una alta expresión en los tres grupos sin mostrar diferencias significativas, esta situación, plantea un efecto inhibitorio del colágeno I sobre la elongación axonal y crecimiento axonal, que el AL no puede revertir en un tratamiento puntual y a largo plazo. La posibilidad de prolongar continuamente la acción de AL, podría lograrse utilizando microbombas de perfusión para administrarlo de forma constante o mediante el empleo de nanopartículas que liberen AL lentamente durante un período más prolongado (Hsu *et al.*, 2004). Otros tipos de colágeno, como el VI y el IV, desempeñan un papel activo en la regeneración de los NP. El colágeno VI ha sido identificado como un nuevo regulador en este proceso, ya que induce la migración y polarización de macrófagos, favoreciendo la regeneración nerviosa y la recuperación funcional tras una lesión del NI (Li *et al.*, 2022), los que son motivo de futuros estudios sobre de su expresión bajo el tratamiento con AL. Este trabajo sienta las bases para estrategias terapéuticas en medicina regenerativa de los NP, basada en la administración intraneural de AL y otros modelos de moléculas que modulen el proceso inflamatorio y el proceso regenerativo.

## AGRADECIMIENTOS

Al Centro de Excelencia de Biotecnología en Reproducción (CEBIOR) y al Centro de Excelencia en Estudios Morfológicos y Quirúrgicos (CEMyQ) de la Universidad de La Frontera, por acceder al uso de sus equipos que permitieron la captura de imágenes. Al Bioterio de la Universidad de La Frontera. Al programa de Magíster en Ciencias mención Biología de la Reproducción por la beca de Magíster para Estudiantes Vinculados al Pre y Postgrado, Beca de exención de arancel (RE. DAP.: 228/2023) y Beca de manutención. Al profesor Dr. Fernando Dias por facilitar el instrumental de compresión.

---

LABRAÑA-OJEDA, N.; ISLA-MEDINA, C.; VIDAL-SEGUEL, N. & MONTIEL-EULEFI, E. Modulation of type I and III collagen by lactic acid in sciatic nerve remodeling after compression injury: Histochemical analysis with sirius red in Sprague-Dawley rats. *Int. J. Morphol.*, 43(4):1337-1343, 2025.

**SUMMARY.** The sciatic nerve (SN), following a compression injury, undergoes either a regeneration process or fibrosis as a consequence of dysregulated inflammation. Lactic acid (LA) has been shown to modulate the inflammatory response in the peripheral nerve by promoting the macrophages anti-inflammatory phenotype. Macrophages play a fundamental role in the Wallerian degeneration process by clearing cellular debris and degrading collagen in the damaged area, facilitating a clearance phenomenon prior to the remodeling of the injured nerve region. Collagen, which constitutes nearly half of the nerve tissue proteins, has a dual role in regeneration: while type I collagen inhibits axonal growth and promotes fibrosis, type III collagen is associated with cell survival and regenerative processes. This study analyzes the

expression of type I and type III collagen during sciatic nerve remodeling to seven days, post-injury, using Sirius Red (SR) staining in Sprague Dawley rats subjected to compression (15 kg/10 min) and treated with intraneural injection of LA. Collagen quantification was performed through image analysis of SR-stained histological sections. The results demonstrated that intraneural LA injection reduces total collagen and increases type III collagen at seven days, post-injury, suggesting that LA not only decreases fibrosis but also fosters a regenerative environment through the induction of type III collagen. This research provides novel insights into the role of LA in the regenerative therapy of nerve injuries.

**KEY WORDS: Collagen Type I; Collagen Type III; Peripheral Nerve Injuries; Sciatic Nerve; Lactic Acid.**

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Aman, M.; Zimmermann, K. S.; Thielen, M.; Thomas, B.; Daeschler, S.; Boecker, A. H.; Stolle, A.; Bigdeli, A. K.; Kneser, U. & Harhaus, L. An Epidemiological and Etiological Analysis of 5026 Peripheral Nerve Lesions from a European Level I Trauma Center. *J. Pers. Med.*, 12(10):1673, 2022.
- Baidoo, N.; Crawley, E.; Knowles, C. H.; Sanger, G. J. & Belai, A. Total collagen content and distribution is increased in human colon during advancing age. *PLoS One*, 17(6):e0269689, 2022.
- Baradaran, A.; El-Hawary, H.; Efanov, J. I. & Xu, L. Peripheral Nerve Healing: So near and Yet so Far. *Semin. Plast. Surg.*, 35(3):204-10, 2021.
- Bi, Y.; Duan, W. & Silver, J. Collagen I is a critical organizer of scarring and CNS regeneration failure. bioRxiv [Preprint], 2024.05.07.592424, 2024.
- Cao, J.; Xiao, Z.; Jin, W.; Chen, B.; Meng, D.; Ding, W.; Han, S.; Hou, X.; Zhu, T.; Yuan, B.; et al. Induction of rat facial nerve regeneration by functional collagen scaffolds. *Biomaterials*, 34(4):1302-10, 2013.
- Colegio, O. R.; Chu, N. Q.; Szabo, A. L.; Chu, T.; Rhebergen, A. M.; Jairam, V.; Cyrus, N.; Brokowski, C. E.; Eisenbarth, S. C.; Phillips, G. M.; et al. Functional polarization of tumour-associated macrophages by tumour-derived lactic acid. *Nature*, 513(7519): 559-63, 2014.
- Comité Asesor de Bioética Fondecyt-Conicyt. *Aspectos Bioéticos de la Experimentación Animal*. 4to Taller de Bioética: Aspectos Bioéticos de la Experimentación Animal. Santiago de Chile, Comité Asesor de Bioética Fondecyt-Conicyt, 2009.
- Deal, D. N.; Griffin, J. W. & Hogan, M. V. Nerve conduits for nerve repair or reconstruction. *J. Am. Acad. Orthop. Surg.*, 20(2):63-8, 2012.
- Gaudet, A. D.; Popovich, P. G. & Ramer, M. S. Wallerian degeneration: gaining perspective on inflammatory events after peripheral nerve injury. *J. Neuroinflammation*, 8:110, 2011.
- Grinsell, D. & Keating, C. P. Peripheral nerve reconstruction after injury: a review of clinical and experimental therapies. *Biomed. Res. Int.*, 2014:698256, 2014.
- Herrera-Bravo, J.; Montiel-Eulefi, E.; Glaser, T.; Garcés, M.; Leal, P. & Henning Ulrich, A. In vitro translocation cytoplasm/nucleus of embryonic transcription factor OCT-4 in perivascular cells suggests that aorta as a niche of quiescent adult stem cells. *Int. J. Morphol.*, 31(4):1430-8, 2013.
- Hoque, R.; Farooq, A.; Ghani, A.; Gorelick, F. & Mehal, W. Z. Lactate reduces liver and pancreatic injury in Toll-like receptor- and inflammasome-mediated inflammation via GPR81-mediated suppression of innate immunity. *Gastroenterology*, 146(7):1763-74, 2014.
- Hsu, S. H.; Chang, C. J.; Tang, C. M. & Lin, F. T. In vitro and in vivo effects of Ginkgo biloba extract EGB 761 on seeded Schwann cells within poly(DL-lactic acid-co-glycolic acid) conduits for peripheral nerve regeneration. *J. Biomater. Appl.*, 19(2):163-82, 2004.
- Kaemmer, D.; Bozkurt, A.; Otto, J.; Junge, K.; Klink, C.; Weis, J.; Sellhaus, B.; O'Dey, D. M.; Pallua, N.; Jansen, M.; et al. Evaluation of tissue components in the peripheral nervous system using Sirius red staining and immunohistochemistry: a comparative study (human, pig, rat). *J. Neurosci. Methods*, 190(1):112-6, 2010.
- Kim, B. S.; Choi, J. H.; Baek, S. H. & Lee, D. H. Effects of intraneural injection of dexmedetomidine in combination with ropivacaine in rat sciatic nerve block. *Reg. Anesth. Pain Med.*, 43(4):378-84, 2018.
- Koopmans, G.; Hasse, B. & Sinis, N. Chapter 19: The role of collagen in peripheral nerve repair. *Int. Rev. Neurobiol.*, 87:363-79, 2009.
- Li, X.; Zhang, X.; Hao, M.; Wang, D.; Jiang, Z.; Sun, L.; Gao, Y.; Jin, Y.; Lei, P. & Zhuo, Y. The application of collagen in the repair of peripheral nerve defect. In *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology. Frontiers Media S.A.*, 10, 2022.
- Lin-Hui, L.; Yuan-Yuan, Z.; Ming-Yu, L.; Xu-Dong, H.; Yin-Jia, D.; Yue, Z.; Yang-Hong-Hong, F.; Ai-Fen, C.; Xu-Dong, Z.; Zheng-Li, C.; et al. Recombinant human collagen type III improves hypertrophic scarring by regulating the ratio of type I/III collagen. *J. Burn Care Res.*, 45(5):1269-73, 2024.
- Magistretti, P. J. & Allaman, I. Lactate in the brain: from metabolic end-product to signalling molecule. *Nat. Rev. Neurosci.*, 19(4):235-49, 2018.
- Rosso, G.; Liashkovich, I.; Gess, B.; Young, P.; Kun, A. & Shahin, V. Unravelling crucial biomechanical resilience of myelinated peripheral nerve fibres provided by the Schwann cell basal lamina and PMP22. *Sci. Rep.*, 4:7286, 2014.
- Schiaveto de Souza, A.; da Silva, C. A. & Del Bel, E. A. Methodological evaluation to analyze functional recovery after sciatic nerve injury. *J. Neurotrauma*, 21(5):627-35, 2004.
- Schindelin, J.; Arganda-Carreras, I.; Frise, E.; Kaynig, V.; Longair, M.; Pietzsch, T.; Preibisch, S.; Rueden, C.; Saalfeld, S.; Schmid, B.; et al. Fiji: an open-source platform for biological-image analysis. *Nat. Methods*, 9(7):676-82, 2012.
- Vidal-Seguel, N., & Montiel-Eulefi, E. Effect of lactic acid on the cellular response of the immune system during the early inflammatory phase in the sciatic nerve damaged by compression. *Int. J. Morphol.*, 37(4):1527-33, 2019.
- Yu, C.; Wang, X. & Qin, J. Effect of necrostatin-1 on sciatic nerve crush injury in rat models. *J. Orthop. Surg. Res.*, 18(1):74, 2023.
- Zheng, X.; Boyer, L.; Jin, M.; Mertens, J.; Kim, Y.; Ma, L.; Ma, L.; Hamm, M.; Gage, F. H. & Hunter, T. Metabolic reprogramming during neuronal differentiation from aerobic glycolysis to neuronal oxidative phosphorylation. *Elife*, 5:e13374, 2016.

Autor de correspondencia:  
Enrique Montiel-Eulefi  
Universidad de La Frontera  
Facultad de Medicina  
Centro de Biotecnología en Reproducción  
CEBIOR  
Montevideo 0870  
Temuco 4811322  
CHILE

E-mail: enrique.montiel@ufrontera.cl