

**RESTITUCIÓ FUNCIONAL I  
ESPECIFICITAT DE LA REINNERVACIÓ  
DESPRÉS DE LESIONS I REPARACIONS  
DEL NERVI PERIFÈRIC**

Antoni Valero Cabré

Tesi Doctoral

1999



Universitat Autònoma de Barcelona  
Facultat de Medicina

**RESTITUCIÓ FUNCIONAL I  
ESPECIFICITAT DE LA REINNERVACIÓ  
DESPRÉS DE LESIONS I REPARACIONS  
DEL NERVI PERIFÈRIC**

Tesi presentada per a l'obtenció del grau de doctor en Medicina i Cirurgia  
per Antoni Valero Cabré

Bellaterra (Barcelona), setembre de 1999

Departament de Biologia Cel·lular  
i de Fisiologia  
Unitat de Fisiologia

Edifici M  
08193 Bellaterra (Barcelona) Spain  
Tel.: (3) 581 19 19  
Fax: (3) 581 20 04  
Tèlex: 52040 EDUCIE



**XAVIER NAVARRO ACEBES**, professor titular del Departament de Biologia Cel·lular i Fisiologia de la Universitat Autònoma de Barcelona,

**CERTIFICA:**

Que el treball de recerca titulat "Restitució funcional i especificitat de la reinnervació després de lesions i reparacions del nervi perifèric", presentat per **Antoni Valero Cabré** per optar al grau de Doctor en Medicina i Cirurgia, que ha estat realitzat sota la seva direcció, compleix tots els requisits per ser defensat públicament.

I així ho fa constar, per a tots els efectes que es puguin considerar oportuns a Bellaterra, a 10 de setembre de 1999

A handwritten signature in black ink, appearing to read 'X. Navarro Acebes', written in a cursive style.

Dr. Xavier Navarro Acebes



## AGRAÏMENTS

Voldria expressar el meu agraïment més sincer a totes aquelles persones que d'una manera o altra han col·laborat a la realització d'aquesta tesi doctoral. Més enllà del treball científic, la realització d'aquesta memòria ha suposat una etapa de transformació personal i professional difícil d'oblidar en aquest moments

En primer lloc al Dr. Xavier Navarro Acebes per haver-me "arrosegat" del món de la medicina al de la recerca biomèdica i haver-me ofert la possibilitat de treballar al seu equip. També per la seva saviesa, constància, dedicació, bons consells i eficàcia sense els quals aquesta tesi doctoral no seria a les vostres mans.

Als companys de laboratori de la Universitat Autònoma de Barcelona de tots aquests anys. Molt especialment a Enric Verdú per la seva inestimable ajuda i amistat dins i fora de les parets del laboratori. Als Drs. Dolores Ceballos, Francisco Javier Rodríguez, Jorge Vilches, Joaquim Forés, Miquel Butí, Juanjo Lázaro, Rafael Labrador per la seva col·laboració i companyonia durant les llargues hores de treball.

Als companys i col·legues de la Unitat de Fisiologia Mèdica amb qui he compartir el plaer de la docència i la vida universitària: Eduard Escrich, Montserrat Solanas, Raquel Moral, Toni Hurtado i la resta de professors de la Unitat de Fisiologia; a Mònica Espejo, Luisa Guerrero i Mercè Argemí. Als estudiants de la Facultat d'aquests anys i als alumnes interns de la unitat: Anna, Montse, Sandra Castaño i Maria Orriols, per les seves insidioses preguntes i la seva col·laboració en alguns experiments.

Als professors i amics d'aquesta i altres facultats: Dr. José Ramon Sañudo, Dra. Lourdes Fañanás, Dr. Anastas Popratiloff, Dr. Rodrigo Pascual, Dr. Àlvar Martínez-Vidal, Dr. Jordi Pérez, Dr. Ishar Dalmau i Dr. Miquel Vilardell, per les seves ensenyances i el seu recolzament en alguns moments "difícils", per compartir la passió per la universitat. Espero haver-me encomanat de les seves grans virtuts com a investigadors, professors i sobretot com a persones.

A les amigues i amics que m'han mantingut lligat i en contacte amb el món "real": Bruno Cruz, David Farreras, David Ferrer, Eros Castagno, Juan Carlos Cano, Josep Picas, Victòria Currubí i Roser Saurí (1992-1996). Als membres de l'Associació d'Estudiants de Neurociències de la Universitat Autònoma de Barcelona que ha estat una activitat més de la vida de doctorand. Finalment i de manera molt especial a Stéphanie Molinard, per aprendre a no confondre llunyania amb oblit i ser pacient sense acostumar-se a esperar.

Al pare i a la mare

# Índex

<b>I. Introducció</b>	<b>1</b>
1. Les lesions de nervis perifèrics	2
1.1. Agents causants de lesions de nervis perifèrics	2
1.2. Manifestacions clíniques de les lesions nervioses	2
1.3. Classificació de les lesions nervioses	3
1.4. Reparació de lesions de nervis perifèrics	5
1.5. Requisits bàsics per assolir la restitució funcional	9
2. Neurobiologia de la degeneració i la regeneració nerviosa	10
2.1. Degeneració walleriana	10
2.2. Degeneració retrògrada	13
2.3. Reacció neuronal i cromatòlisi	14
2.4. Canvis de la glia central	16
2.5. Regeneració axonal	17
3. Denervació i reinnervació d'òrgans diana	21
3.1. Canvis en els òrgans diana dénervats	21
3.2. Reinnervació perifèrica	24
4. Especificitat de la reinnervació perifèrica	27
4.1. Poliinervació, hiperinnervació, innervació aberrant	28
4.2. Activitat neurotròpica i nivells d'especificitat	29
5. Reorganització funcional després de lesions del sistema nerviós perifèric	33
5.1. Canvis cel·lulars i sinàptics	33
5.2. Plasticitat central postlesió perifèrica	36
5.3. Paper de l'activitat reflexa	38
6. La funció global de locomoció	44
6.1. Fases del moviment de deambulació en quadrúpedes	44
6.2. Mecanismes espinals de la locomoció	44
6.3. Coordinació i control de la locomoció	45
6.4. Efecte de les lesions perifèriques sobre la locomoció	46
6.5. Quantificació de la recuperació funcional global després de lesions	46
<b>II. Objectius</b>	<b>49</b>
<b>III. Materials i Mètodes</b>	<b>53</b>
1. Model animal	54
2. Procediments quirúrgics	54
3. Grups experimentals	58
4. Avaluació funcional de la regeneració nerviosa i la reinnervació	59
5. Recuperació de la funció locomotora global	63
6. Avaluació electrofisiològica de l'especificitat de la reinnervació perifèrica	65
7. Avaluació morfològica de l'especificitat de la reinnervació perifèrica	66
8. Avaluació funcional de les respostes reflexes espinals	69
9. Protocol de seguiment	71
10. Anàlisi de les dades	72
11. Valors absoluts controls	74
<b>IV. Resultats</b>	<b>75</b>
1. Regeneració i reinnervació de diferents tipus de fibres nervioses	76
1.1. Regeneració de fibres sudomotores	76
1.2. Regeneració i reinnervació de fibres nociceptives	78
1.3. Regeneració i reinnervació de fibres motores	80
1.4. Regeneració de fibres sensorials gruixudes	89

1.5. Comparació de la capacitat regenerativa de diferents tipus de fibres nervioses	98
1.6. Corol·lari-resum	100
2. Recuperació del patró de locomoció	102
2.1. Longitud de la petjada (PL)	102
2.2. Separació entre dits (TS)	105
2.3. Separació entre dits intermedis (IT)	106
2.4. Índex Funcional del nervi ciàtic (IFC)	106
3. Especificitat de la reinnervació: avaluació funcional	110
3.1. Territoris d'innervació motora, sensorial i autonòmica en animals controls	110
3.2. Territoris d'innervació motora, sensorial i autonòmica després de lesions	115
3.3. Territoris d'innervació sensorial	122
3.4. Territoris d'innervació sudomotora	128
3.5. Especificitat de reinnervació de diferents tipus de fibres nervioses	130
3.6. Corol·lari-resum	133
4. Especificitat de la reinnervació: avaluació histològica	135
4.1. Distribució de nuclis i nombre de motoneurons espinals en animals control	135
4.2. Especificitat histològica de la reinnervació després de lesions	137
4.3. Corol·lari-resum	142
5. Reflexos espinals monosinàptics	144
5.1. L'ona H en animals controls	144
5.2. Evolució postlesió de la relació d'amplitud entre les ones H i M	146
5.3. Evolució postlesió del temps de conducció proximal de l'ona H	155
5.4. Corol·lari-resum	157
6. Respostes reflexes polisinàptiques	158
6.1. Reflexos polisinàptics de retirada en animals controls	158
6.2. Recuperació de respostes reflexes polisinàptiques després de lesions	163
6.3. Excitabilitat de les respostes reflexes polisinàptiques després de lesions	177
6.4. Corol·lari-resum	183
<b>V. Discussió</b>	<b>185</b>
1. Avaluació funcional de la regeneració després de lesions perifèriques	187
1.1. Aspectes metodològics de l'avaluació funcional de regeneració i la reinnervació	187
1.2. Efecte de diferents tipus de lesions i reparacions sobre la reinnervació	189
1.3. Capacitats regeneratives de diferents tipus de fibres nervioses	201
2. Recuperació de la funció de locomoció	205
2.1. Avaluació del patró de locomoció: walking track	205
2.2. Recuperació després de lesions	208
2.3. Utilitat del walking track com a prova d'avaluació global	211
3. Especificitat de la reinnervació perifèrica	215
3.1. Avaluació de l'especificitat de la reinnervació: tècniques funcionals i morfològiques	216
3.2. Característiques de la innervació i territoris musculars, sensorials i autonòmics	220
3.3. Marcatges neuronals de grups experimentals: afectació neuronal per la lesió	224
3.4. Efectes de diferents tipus de lesions sobre l'especificitat de la reinnervació	225
3.5. Especificitat de la reinnervació de diferents tipus de fibres i òrgans diana	235
3.6. Mecanismes reguladors de la capacitat de reinnervació específica	239
4. Recuperació de respostes reflexes espinals	249
4.1. Avaluació dels reflexos monosinàptics i polisinàptics	249
4.2. Reflex espinal monosinàptic	251
4.3. Reflexos espinals polisinàptics	265
4.4. Resum final: recuperació i plasticitat de respostes reflexes espinals	277
<b>VI. Conclusions</b>	<b>279</b>
<b>VII. Bibliografia</b>	<b>283</b>



## ÍNDEX D'ABREVIATURES

**GS** (Funció sudomotora, glàndules sudorípares)  
**ALG** (Sensibilitat nociceptiva, algesimetria)  
**PAMC** (Potencial d'acció Muscular Compost)  
**PANC** (Potencial d'acció Nervios Compost)  
**M** (Ona de despolarització muscular directa)  
**H** (Ona de despolarització muscular del reflex monosinàptic)  
**mPL** (Múscul plantar)  
**mGC** (Múscul gastrocnemi)  
**mTA** (Múscul tibial anterior)  
**mBF** (Múscul bíceps femoris)  
**n4D** (Nervi digital del 4t dit)  
**n5D** (Nervi digital del 5è dit)  
**n2D** (Nervi digital del 2n dit)  
**nTB** (Nervi tibial a nivell del taló)  
**mBFr** (Reflex de retirada ipsilateral sobre el mBF)  
**mGCr** (Reflex de retirada creuat sobre el mGC)  
**mTAr** (Reflex de retirada creuat sobre el mTA)  
**C1/C2/C3** (Primer, segon i tercer components dels reflexos polisinàtics)  
**FB** (retrotraçador Fast Blue)  
**FG** (retrotraçador Fluoro Gold)  
**DiI** (retrotraçador DiI)  
**PL** (Print Length, longitud de la petjada)  
**TS** (Toe Spreading, extensió dels dits)  
**IT** (Intermediary Toes, dits intermitjos)  
**IFC** (Índex Funcional del Nervi Ciàtic)  
**d0** (dia preoperatori)  
**d7, d30, d60, d90** (7, 30, 60 i 90 dies posteriors a la lesió)  
**dpo** (dia postoperatori)

## **I. Introducció**

## **1. Les lesions de nervis perifèrics**

### **1.1. Agents causants de lesions de nervis perifèrics**

Els nervis perifèrics poden afectar-se per una gran varietat d'agressions que comporten en darrera instància lesions estructurals i funcionals dels axons que els componen. Com a conseqüència de la lesió, s'altera la capacitat per a transmetre impulsos nerviosos, i disminueix o desapareix el control neural de les funcions motora, sensorial i autonòmica en els territoris denervats (Waxman 1988). Hi ha un ampli ventall de causes que poden produir una lesió del sistema nerviós perifèric, entre les quals cal destacar les lesions per isquèmia directa (Korthals et al 1989, Schmeltzer et al 1989), l'acció d'agents neurotòxics, afectacions per radiacions, canvis extrems de temperatura ja sigui pel fred (Mira i Fardeau 1978) o per la calor (De Vrind et al 1992, 1993) i lesions mecàniques. Les lesions mecàniques són les afectacions més freqüents i es presenten sota la forma de compressions, friccions o seccions parcials o totals dels nervis perifèrics. Aquestes poden tenir el seu origen en factors endògens de compressió, com és el cas de la síndrome del túnel carpià, o bé ser causades per agents externs en el curs d'accidents traumàtics o per accions iatrogèniques en el curs d'intervencions quirúrgiques (Dawson i Krarup 1989).

Les lesions del nervis perifèrics comporten un conjunt de pèrdues funcionals incapacitants, que poden compensar-se mitjançant tres mecanismes fonamentals: la reinnervació dels òrgans denervats per la regeneració dels axons prèviament lesionats, la reinnervació per ramificació col·lateral d'altres axons indemnes situats a l'entorn, o la reorganització estructural i funcional de circuits del sistema nerviós implicats en la seves accions. L'experiència clínica demostra, però, que aquests mecanismes deixats evolucionar espontàniament no proporcionen sovint una recuperació funcional satisfactòria (Buchtahl i Kuhl 1979, Kline 1985, Sumner 1990, Sunderland 1978) fent-se necessària en molts casos, l'aplicació de procediments terapèutics. Així, després de seccions nervioses no reparades la probabilitat que es produeixi la reinnervació efectiva de dianes musculars, sensorials i autonòmiques és escassa. Al mateix temps, la reinnervació per col·lateralització d'axons veïns indemnes es veu limitada a distàncies relativament curtes i, malgrat una aparent recuperació, altera el normal desenvolupament de la funció. Per últim, els mecanismes de reorganització dels circuits espinals i cerebrals induïts com a conseqüència de la lesió no sempre afavoreixen la compensació funcional del dèficit causar per la lesió i, fins i tot en alguns casos, poden arribar a generar conseqüències negatives i empitjorar l'estat del subjecte afectat. L'aplicació de diferents tècniques terapèutiques, especialment en casos de lesions nervioses greus, pretèn potenciar positivament els efectes de la regeneració, la col·lateralització i la reorganització, per separat o en conjunt i, millorar les possibilitats d'una adequada recuperació funcional.

### **1.2. Manifestacions clíniques de les lesions nervioses**

Clínicament les lesions del nervi perifèric es manifesten per la pèrdua de les diferents funcions mediades pels axons afectats. Així, en el cas de les fibres eferents motores s'observa la paràlisi o

parèsia muscular seguida de la consegüent atròfia dels grups musculars denervats. La lesió de les fibres eferents autonòmiques produeix dèficits del control de les activitats sudomotora, pilomotora i vasomotora, sovint en territoris no totalment coincidents amb els dèficits motors. D'altra banda, l'afectació de les fibres aferents sensorials dóna lloc a la pèrdua parcial o total de les diferents modalitats sensorials (tàctil, dolorosa, tèrmica i propioceptiva). La disminució o pèrdua d'aquestes funcions conformen el conjunt de *síntomes negatius* del trastorn.

Paral·lelament però, es produeixen també una sèrie de *síntomes positius*, derivats de la denervació d'òrgans perifèrics o de canvis en la transmissió dels estímuls perifèrics. D'aquesta manera, es pot detectar en els músculs esquelètics denervats l'existència d'excitació espontània de fibres musculars aïllades (fibril·lacions), unitats motores completes (fasciculacions) o de la totalitat del múscul (espasmes). A nivell autonòmic, es presenta una hipersensibilitat dels òrgans denervats en front als neurotransmissors o agonistes (Cannon 1939), fet que pot conduir a augments exagerats del to vascular perifèric, així com a una activitat sudomotora o vasoconstrictora incrementada de forma compensatòria en regions intactes (Seddon 1943). En la via aferent sensorial es refereixen concomitantment amb la pèrdua de sensibilitat des de sensacions doloroses espontànies en absència d'estímul, dolors importants davant d'estímuls de baixa intensitat (hiperalgèsia), sensacions doloroses davant d'estímuls no dolorosos de fred, calor o tacte (al·lodínia), fins la síndrome del membre fantasma, caracteritzada per la percepció de continuar posseint una extremitat que ha estat amputada i de dolor referit a aquesta en estimular altres parts intactes (Omer et al 1998). Diversos estudis demostren que diferents etiologies que comporten totes elles lesions nervioses determinen quadres simptomàtics semblants (Ochs et al 1989, Dyck 1982, Örne 1962) i que només la localització dels dèficits o excessos en la topografia corporal per mitjà d'una adequada exploració neurològica o els signes externs evidents de lesió permeten establir el diagnòstic correcte. En tot cas, la severitat de les lesions depèn fonamentalment del grau i la localització de la lesió.

### 1.3. Classificació de les lesions nervioses

Les diverses classificacions de les lesions nervioses perifèriques han provat de relacionar els efectes morfològics i estructurals de la lesió amb el dèficit funcional, el pronòstic i la capacitat de recuperació espontània. El fascicle nerviós afectat, la forma de la lesió i la severitat de la mateixa determinen en alguns casos la necessitat o no d'una intervenció quirúrgica i la tècnica a emprar. En aquesta línia, una classificació acurada de les lesions que les relacioni amb l'actitud terapèutica d'elecció en cada cas és d'enorme interès. L'any 1943 Seddon va dividir les lesions en tres grups: *neurapràxia*, *axonotmesi* i *neurotmesi*, segons les seves característiques histològiques (Seddon 1943). La neurapràxia de Seddon és aquell tipus de lesió, generalment d'origen isquèmic o compressiu, que sense produir cap alteració estructural dels axons i els seus embolcalls connectius bloqueja transitòriament la transmissió d'impulsos nerviosos. En l'*axonotmesi* es produeix la interrupció dels axons mantenint-se la integritat de les capes connectives endoneurials, perineurials i epineurials que els envolten. La *neurotmesi* implica la secció troncular completa, incloent axons i embolcalls connectius.



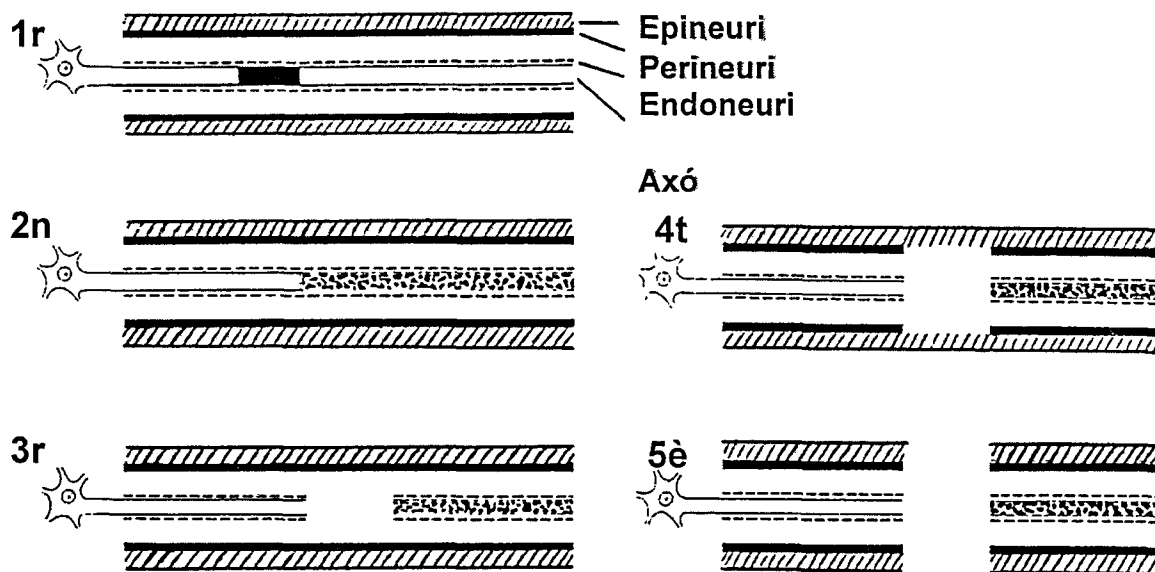


Fig. I.1.1. Esquema il·lustratiu dels cinc graus de lesió nerviosa segons Sunderland de menor a major nivell de gravetat. 1r: Bloqueig de la conducció, 2n: Degeneració axonal amb manteniment de la integritat del tub endoneurial, 3r: Discontinuitat de l'axó i el tub endoneurial, conservant-se intacte el perineuri, 4t: Discontinuitat fascicular i conservació de l'epineuri, 5è: Discontinuitat total del tronc nerviós.

Una segona classificació realitzada per Sunderland (1951, 1978) va matisar els criteris i va ampliar els tres tipus de Seddon a cinc graus de lesions, que tenen en compte no només els criteris morfològics sinó la prognosi de la lesió i el tractament quirúrgic d'elecció. Aquesta s'ha convertit en la més utilitzada actualment en l'àmbit clínic (Fig. I.1.1). El *primer grau* de lesió de la classificació de Sunderland correspon a la neurapràxia de Seddon i representa un bloqueig de la conducció causada probablement per alteracions de la mielina sense alteracions morfològiques dels axons o les capes connectives i sense que es produeixi degeneració axonal. Són lesions que reverteixen en poc temps si s'elimina la causa de compressió o isquèmia. En el *segon grau*, equivalent a l'axonotmesi de Seddon, es produeix la pèrdua de la continuïtat dels axons i la consegüent degeneració walleriana, mantenint-se però la integritat dels tubs endoneurials i la làmina basal de les cèl·lules de Schwann (CS). Donada la correcta orientació dels tubs endoneurials i la poca reacció cicatricial, els axons no tenen problema per elongar-se adequadament fins a reinnervar les seves dianes originals. El *tercer grau* de lesió es caracteritza per la discontinuïtat dels axons i dels tubs endoneurials i la conservació del perineuri que envolta els fascicles. La lesió connectiva indueix una reacció fibrosa i cicatricial intrafascicular que obstaculitza l'avançament dels axons regeneratius. A més, la falta d'alineament dels tubs endoneurials genera deficiències quantitatives del nombre d'axons que poden regenerar distalment i qualitatives afectant l'especificitat en la reinnervació de la diana perifèrica. A les lesions de *quart grau* s'afegeix a tot el quadre anterior la disrupció del perineuri, fet que incrementa la reacció fibrosa, la pèrdua de direcció dels axons i la desestructuració general del tronc nerviós. Finalment el *cinquè grau* de lesió, equivalent a la neurotmesi de Seddon, es caracteritza per la pèrdua completa de continuïtat del tronc nerviós. Com a producte de la retracció dels caps nerviosos o de la pèrdua de teixit neural es pot

generar en aquest grau de lesió una distància interneural entre els caps nerviosos que dificulta la projecció dels axons sobrevivents dels del punt de secció fins a l'extrem distal. Les lesions de primer i segon grau s'acostumen a deixar evolucionar espontàniament sense intervenir quirúrgicament sobre el nervi lesionat, donat que la manca de reacció cicatricial i el bon alineament dels tubs endoneurials o dels fascicles nerviosos asseguren una adequada recuperació funcional, i sovint són lesions parcials del nervi. A partir del tercer grau, les capacitats regeneratives naturals de l'axó queden parcialment o totalment contrarrestades per l'obstacle que suposa la reacció cicatricial i la manca d'alineament. En aquests casos, malgrat els límits establerts per la complexitat de la biologia de la regeneració nerviosa, el tractament quirúrgic es converteix en la teràpia d'elecció (Sunderland 1951, 1991, Lundborg 1987, Kline 1990).

#### **1.4. Reparació de lesions de nervis perifèrics**

L'elecció de la tècnica més adient per a la reparació nerviosa ha estat des de sempre un tema de controvèrsia en la literatura clínica. En darrera instància, la capacitat de regeneració i reinnervació depèn del punt de lesió, del tipus i de la distància que els axons regeneratius han de recórrer des de l'extrem proximal al distal i fins als òrgans perifèrics. Després de seccions o reseccions que comporten la separació física dels extrems del nervi i la desestructuració dels embolcalls epineurials, perineurials i endoneurials, la recuperació funcional està molt compromesa. En aquests casos, existeixen diferents mètodes destinats a millorar les possibilitats de regeneració i reinnervació perifèriques. Amb la introducció de les noves tècniques microquirúrgiques amb microscopis i instrumental microquirúrgic especialitzat i materials de sutura fins i poc traumàtics, ha esdevingut possible disseccionar, identificar i suturar de manera bastant selectiva fascicles individuals del tronc nerviós (Millesi 1981, Kline 1990). La introducció de nous mètodes de tractament, destinats a potenciar la supervivència de les neurones axotomitzades, les capacitats regeneratives que espontàniament mostren els axons afectats o el paper promotor de la regeneració de les cèl·lules no neuronals, són algunes de les darreres aportacions experimentals a la reparació de lesions del sistema nerviós perifèric. L'objectiu final de tota tècnica de reparació és el de restituir la continuïtat del tronc nerviós, per tal d'afavorir l'elongació dels axons regeneratius a través dels tubs endoneurals i una reinnervació quantitativament i qualitativament adequada de les dianes musculars, sensorials i autonòmiques (Millesi i Terzis 1984). Així, s'han establert quatre punts quirúrgics bàsics a tenir en compte en qualsevol reparació nerviosa: (a) l'eliminació de formacions cicatricials produïdes en ambdós extrems del nervi lesionat i la separació dels fascicles que els componen; (b) l'aproximació dels extrems nerviosos limitant al màxim la distància interneural i la tensió produïda sobre els fascicles; (c) la coaptació d'ambdós extrems, assegurant la màxima coincidència possible dels diferents fascicles del nervi afectat i evitant creuaments de fascicles anatòmicament o funcionalment no concordants, mitjançant la sutura directa o bé l'ús de mètodes indirectes com els empelts o les guies neurals; i (d) garantir l'estabilitat de la coaptació durant el període de temps mínim necessari per assegurar la cicatrització de les capes connectives i l'elongació distal dels axons a través del punt de lesió (Millesi i Terzis 1984).

#### *1.4.1. Sutura directa epineurial*

La mobilització i la coaptació dels extrems nerviosos mitjançant la sutura epineurial és el mètode clàssic de reparació de lesions per secció sense pèrdua important de teixit neural. És important eliminar les escares cicatricials dels extrems, orientar adequadament els fascicles sobre la base de les estructures fasciculars i vasculars, utilitzar el nombre mínim de sutures poc apretades per evitar la compressió axonal i evitar la sutura tensionada (Kline 1990). Es recomana en lesions netes de troncs preferentment monofasciculars, donat que és freqüent el desalineament dels fascicles i la reinnervació aberrant de dianes perifèriques (Edshage 1964). Una alternativa en troncs amb diversos fascicles és la sutura fascicular a través del perineuri, que presenta l'avantatge d'assegurar un afrontament entre extrems distals i proximals dels diferents fascicles seccionats. Per a ser realitzada es requereix, però, d'un microscopi quirúrgic i d'una destacada habilitat quirúrgica. A més, només pot ser practicada com a procediment primari en lesions que no facin necessària la ressecció dels caps nerviosos, donat que aleshores es dificulta la identificació dels fascicles. Es tracta, a més, de sutures múltiples que poden generar una elevada reacció cicatricial i edema que entorpeix l'elongació axonal i que són poc resistents a la tensió (Lundborg 1988, Kline 1990). Finalment, no resulta útil per a la reparació de lesions de nervis en punts distals de les extremitats, on presenten un elevat grau de fasciculació (Sunderland 1991).

#### *1.4.2 Reparació per empelt nerviós*

En aquelles lesions que, per la pèrdua d'un segment de nervi o la retracció elàstica dels extrems, presenten una distància interneural que impedeix la correcta sutura epineurial directa, s'aconsella la implantació d'un empelt nerviós. La manca de reparació d'aquestes lesions, tot esperant la regeneració espontània dels axons a través de l'espai extraneural generat per la lesió, acostuma a resultar en la formació d'un neuroma proximal. La manca d'un terreny propici per a la regeneració axonal i la reacció cicatricial acaben constituint a l'extrem nerviós proximal una cabdell d'axons regeneratius i teixit connectiu que impedeix de manera física el seu avenç. La introducció d'un segment de nervi entre els caps neurals aconpleix d'una banda la funció de pont o guia dels axons cap a l'extrem distal, al mateix temps que ofereix un entorn òptim per a la regeneració (Kline 1990). Les CS d'un nervi empeltat i adequadament vascularitzat sobreviuen, es multipliquen, formen bandes de Büngner i conjuntament amb la seva làmina basal promouen l'emissió de neurites (Aguayo 1976). Durant els primers dies l'empelt sobreviu a partir de la difusió de factors de l'entorn. A partir de les 72 hores l'empelt es vascularitza. Per aquesta raó, els empelts de gran llargada i gruix tenen menys probabilitat d'esdevenir viables en la reparació d'aquestes lesions (Lundborg 1988). Es poden utilitzar empelts procedents d'un subjecte d'una altra espècie (xenogènics), d'un individu de la mateixa espècie (singènics o heteròlegs) o bé procedents del mateix pacient (autòlegs). Els assaigs experimentals i clínics mostren que els empelts heteròlegs presenten en general resultats de recuperació desencoratjadors degut a la reacció immunològica de rebuig que generen. Al cap de poques hores l'empelt mostra una invasió per macròfags que l'eliminen, convertint-lo en pocs dies en una massa fibrosa en la qual no hi ha signes de reinnervació (Sunderland 1978). El tractament immunosupressor pot reduir la resposta de rebuig, però les seves complicacions coadjuvants no

justifiquen el seu ús continu (Evans et al 1994). Els autoinjerts són, ara per ara, el tractament d'elecció en lesions nervioses amb un espai interneural de més de 1-2 cm. Donat que l'empelt s'ha d'obtenir del mateix individu, s'acostumen a utilitzar com a donants nervis de limitada repercussió funcional, generalment nervis sensorials, com els nervis sural, cutani anterobraquial, interossis posteriors, radial superficial o femoral cutani (Millesi 1981, Wilgis i Maxwell 1976). L'empelt actua de forma equivalent a un segment distal nerviós, encara que presenta una degeneració walleriana més lenta que la del propi nervi lesionat. Finalment, acabarà resultant una estructura connectiva rica en CS i factors promotors de la regeneració que afavorirà l'elongació axonal fins al veritable extrem nerviós distal. De tota manera, els resultats clínics de la seva utilització són relativament pobres, de manera que en lesions de nervis de l'avantbraç, només un 25% dels afectats presenten una recuperació significativa de l'activitat motora (Young et al 1980). A més, l'autoempelt comporta un conjunt de problemes secundaris, com són: l'obligada realització d'un segon pas quirúrgic, l'eliminació d'un nervi funcional, la limitació de volum de nervis donants i la dificultat per trobar un empelt que s'adapti a les dimensions i grau de fasciculació del nervi a reparar.

#### *1.4.3 Reparació per tubulització*

La tubulització és una tècnica alternativa a l'empelt en lesions de resecció, que consisteix en interposar entre els extrems nerviosos una guia o conducte tubular encarregada d'establir un pont entre els extrems del nervi tallat i d'aïllar l'espai intern del medi extraneural, que orienta l'elongació dels axons regeneratius. Aquest procediment ha constituït un model experimental molt útil per a la investigació dels processos cel·lulars i bioquímics de la regeneració nerviosa (Lundborg et al 1982c, Williams et al 1983, Longo et al 1984, Le Beau et al 1988, Liu 1996) i ha estat aplicat com a mètode reparatiu tant en nombrosos estudis experimentals (Fields et al 1989, Butí et al 1996, Doolabh et al 1996) com en assajos clínics limitats (Mackinnon i Dellon 1990, Lundborg et al 1997). Estudis morfològics han demostrat que entre 1 i 2 dies després de la implantació del tub, la seva llum s'omple per extravasació sanguínia d'un fluïd, que en coagular conforma al seu interior una matriu de fibrina que conté molècules de la matriu extracel·lular i elements cel·lulars, que uneix els dos caps del nervi tubulat (Williams et al 1983, Le Beau et al 1988, Liu 1996). Pocs dies després, es comença a produir una migració de fibroblastes, cèl·lules endotelials i de CS que repoblen la matriu des dels dos extrems del nervi. Als 14 dies de la reparació, les CS han pogut colonitzar la totalitat del cordó intratubular, mentre que al segment proximal es comencen a observar axons regeneratius, majoritàriament amielínics. En aquest estadi, la fibrina del cordó connectiu es degradada per fibrinòlisi i es va substituint progressivament per col·lagen produït pels fibroblastes, que conformarà una veritable membrana basal sobre la qual s'adheriran les CS. A les 3 setmanes, les cèl·lules no neuronals han cobert tota l'extensió tubular, s'observa la neovascularització de la matriu i la presència d'axons amielínics arribant a l'extrem distal del tub i de mielínics a la línia mitja. Finalment, a les 4 setmanes, els axons han travessat tota la guia neural. Els axons mielínics mostren un embolcall de mielina molt prim en comparació amb la del segment proximal, amb el temps, però, el nervi regeneratiu madurarà i incrementarà el seu diàmetre. El cordó regeneratiu acostuma a situar-se centrat en la llum del tub, compost de nombrosos fascicles petits amb axons mielínics i amielínics i envoltats



per una fina capa de perineuri (Williams et al 1983, Liu 1996). L'anàlisi del fluïd acumulat en tubs implantats ha demostrat la presència de proteïnes amb activitat tròfica sobre cultius de neurones motores, sensorials i simpàtiques (Longo et al 1983, LeBeau et al 1988), alliberades per cèl·lules no neuronals. També s'ha pogut demostrar la presència en la matriu de fibrina de monòmers de fibronectina, laminina i col·lagen, components tots ells de la matriu extracel·lular que promouen la regeneració i la migració de CS (Longo et al 1984). Aquests components presenten un tripèptid de propietats adhesives (Arg-Gly-Asp) que és reconegut per receptors d'integrines de cèl·lules endotelials o de Schwann i juntament amb el col·lagen acabaran condensant-se en la constitució de la membrana basal del tub endoneurial.

La tubulització és un mètode reparatiu que presenta alguns avantatges sobre la reparació per empelt: d'una banda, limita la formació de neuroma i de teixit cicatricial en el punt de reparació, s'encarrega de guiar els axons fins a l'extrem distal i evita l'escapament de fibres per fora de l'empelt i, finalment, resulta una tècnica reparativa fàcil de realitzar, fins i tot en mans no excessivament expertes (Lundborg et al 1982b). És també probable que la tubulització de nervis multifasciculars sigui una bona alternativa a l'empelt o a la sutura directa, en la mesura que l'espai entre extrem distal i proximal deixaria expressar les propietats neurotròpiques dels axons en la seva navegació distal (Politis et al 1982). Encara que la tubulització mostra en reseccions millors resultats que la no reparació de la lesió, la seva eficàcia està, però, limitada per la longitud de la distància interneural a cobrir. Així, en els pioners estudis emprant tubs de silicona es va veure que, en distàncies de fins a 10 mm de longitud al nervi ciàtic de la rata, aquesta reparació aconsegueix generalment la formació de cordons regeneratius, mentre que entre 10 mm i 15 mm la proporció d'animals amb regeneració disminueix marcadament (Lundborg et al 1982b, Williams et al 1983). La separació interneural màxima per a la qual la reparació per tubulització és aplicable varia en funció de la massa de teixit nerviós reparat i, per tant, del tamany de l'animal i del nervi en qüestió. Així, la longitud interneural limitant augmenta proporcionalment en diferents espècies: 4 mm al ratolí (Henry et al 1985, Butí et al 1996), 10 mm a la rata (Lundborg et al 1982b, Seckel et al 1984) i el conill (Molander et al 1983) i fins uns 30 mm en primats (Dellon i Mackinnon 1988, Archibald et al 1995). Amb distàncies interneurals curtes, la reinnervació funcional d'òrgans diana és similar en reparacions per tubulització o empelt (Archibald et al 1991, 1995, Gibby et al 1983, Navarro et al 1994). Per contra, en distàncies mitges o llargues, l'empelt assegura una recuperació funcional superior que la tubulització (Müller et al 1987, Navarro i Kennedy 1989). De tota manera, les capacitats de permeabilitat, durabilitat i adhesió cel·lular del tub són variables que poden influenciar i optimitzar la regeneració en distàncies interneurals llargues (Navarro et al 1996).

#### *1.4.4 Perspectives clíniques en la reparació nerviosa*

Durant temps, la recerca destinada a millorar el grau de recuperació després de lesions s'ha centrat en el refinament de les tècniques quirúrgiques emprades per a suturar o empeltar els extrems nerviosos, però aquesta via ha assolit probablement ja un cert grau d'estancament sense que s'hagi aconseguit garantir, fins i tot en lesions relativament lleus, una recuperació satisfactòria (Omer et al 1998). El

progressiu coneixement dels mecanismes moleculars que regulen la degeneració i la regeneració axonal i la reinnervació d'òrgans diana està destinat a jugar un paper fonamental per al futur. Així, l'aplicació de factors neurotròfics o la implantació d'elements cel·lulars encarregats de produir-los semblen les vies de futur de més interès per al tractament de lesions nervioses. En aquest procés s'haurà de començar a tenir en compte no només la "quantitat" de reinnervació, però també la "qualitat" i "especificitat" de la reinnervació de dianes perifèriques. Finalment, el gran interès que desperta la recerca sobre els mecanismes de connectivitat espinal i cortical i la capacitat reorganitzativa de les xarxes neuronals al sistema nerviós central, haurà de poder ser aprofitat en un futur per a desenvolupar tècniques de reaprenentatge i reespecificació de funcions cerebrals (Lundborg et al 1993). Així, hi ha estudis que demostren que factors com les capacitats d'aprenentatge verbal o visuoespacial són importants per a la recuperació de la sensibilitat després de lesions en individus adults (Lundborg et al 1994b, Rosén et al 1994)

### **1.5 Requisits bàsics per assolir la restitució funcional**

Per tal d'aconseguir un bon grau de recuperació funcional de l'activitat o activitats motores i d'anàlisi sensorial en les quals el nervi lesionat està implicat, cal que es compleixin cinc requisits bàsics i fonamentals (Madison et al 1987, Fu i Gordon 1997):

- a) Que hi hagi una bona supervivència de les neurones axotomitzades per la lesió
- b) Que els axons regenerin exitosament a través del punt de lesió
- c) Que els axons aconseguixin reinnervar de manera específica les seves dianes originals
- d) Que les neurones reestableixen un patró de connexions centrals, espinals i corticals, semblant a l'original o compatible amb el desenvolupament de la seva funció

Només en cas que s'acompleixin tots aquests requisits s'aconseguirà no només la reinnervació i la recuperació de paràmetres funcionals aïllats (resposta al dolor, reinnervació sudomotora, amplitud i latència dels potencials d'acció nerviós i muscular compostos) fins a valors semblants als preoperatoris, sinó també la recuperació de la funció global de deambulació.

## 2. Neurobiologia de la degeneració i la regeneració nerviosa

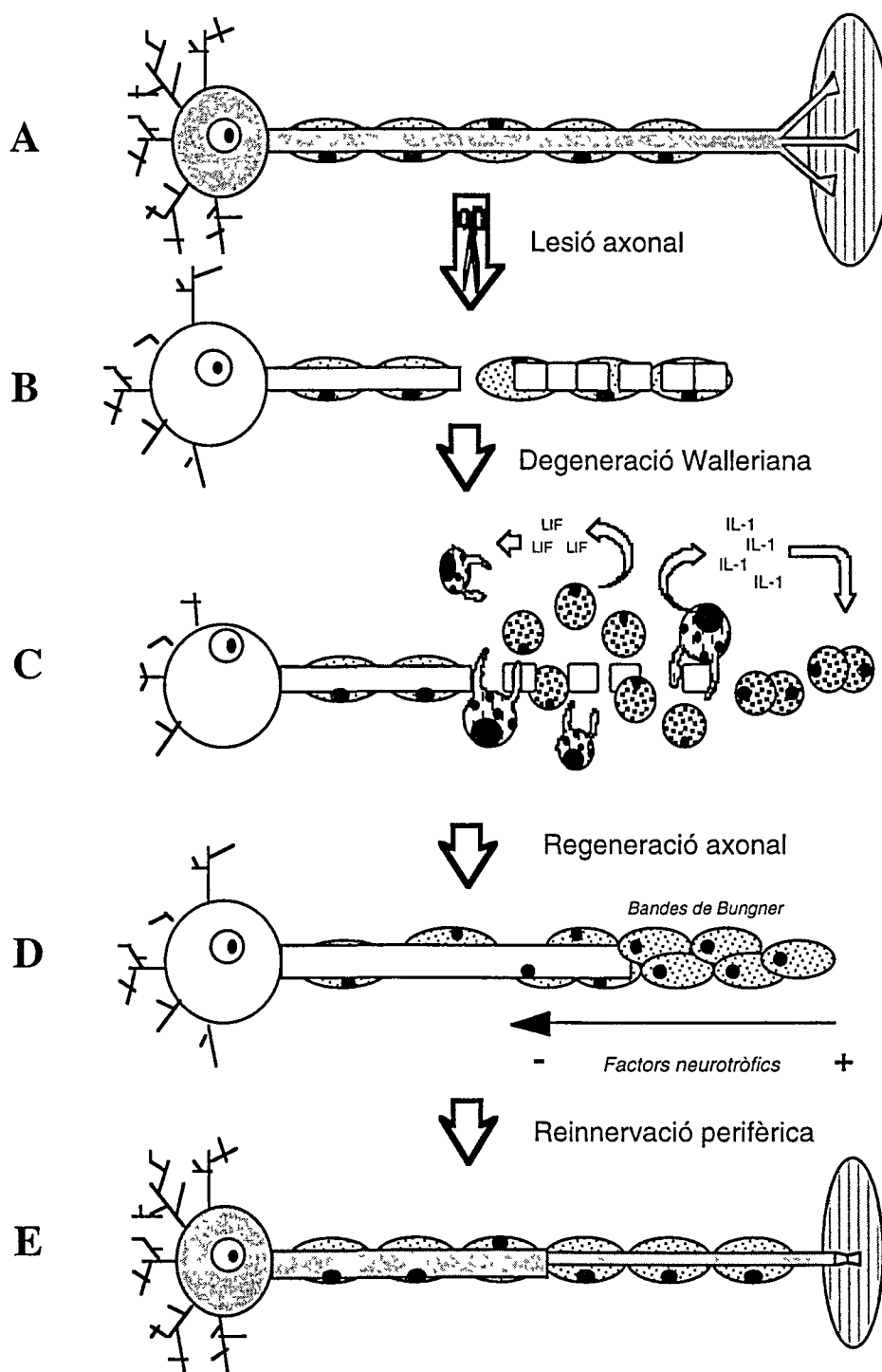
L'èxit de la regeneració nerviosa depèn en primera instància de la capacitat de les neurones de sobreviure a l'axotomia. La mort neuronal es produeix per apoptosi (Lo et al 1995) i està probablement induïda per la manca o la dificultat d'accés a diferents factors tròfics alliberats pels òrgans distals o bé per cèl·lules glials tant de l'entorn de l'axó com del soma de la neurona (Korshing 1993). La mort neuronal és quantitativament molt més important en lesions axonals properes al cos neuronal que en afectacions més distals (Sunderland 1978) i afecta més les neurones sensorials que les motores (Melville et al 1989). Les lesions axonals neonatals o postnatsals produeixen efectes més devastadors sobre la població neuronal que en períodes adults (Snider et al 1992). En tot cas, la incidència d'apoptosis en neurones motores després de lesions perifèriques en animals adults és negligible (Gordon et al 1991).

La compressió o la seció d'un nervi perifèric desencadena la degradació de les fibres nervioses distalment a la zona de lesió mitjançant un procés conegut com a *degeneració walleriana*. L'objectiu final d'aquest procés és eliminar els residus de fibres nervioses aïllades del soma neuronal i crear un microambient al segment distal a la lesió que esdevingui favorable per a la posterior regeneració dels axons supervivents. Al mateix temps, la reacció axonal retrògrada i la cromatòlisi preparen la neurona i modifiquen els seus mecanismes de síntesi metabòlica per possibilitar la regeneració de l'axó. La regeneració constitueix el conjunt de mecanismes moleculars i cel·lulars que fan possible la reconstitució i l'elongació del axó que s'ha perdut i la reinnervació dels òrgans diana (Selzer 1980, Fawcett i Keynes 1990, Fu i Gordon 1997) (Fig. I.2.1). Els canvis morfològics, fisiològics i bioquímics observats en neurones lesionades són el resultat de modificacions en l'expressió gènica de neurones i cèl·lules glials. En les neurones aquestes transformacions estan destinades a promoure la síntesi d'enzims, cofactors i factors que afavoreixin la supervivència neuronal i el creixement de l'axó, mentre que, en cèl·lules glials, està destinat a la proliferació cel·lular i la secreció de factors que afavoreixin el trofisme i tropisme axonal.

### 2.1. Degeneració walleriana

Els primers signes de *degeneració walleriana* es detecten tan sols 24 hores després de la lesió nerviosa i es perllonga durant gairebé dues setmanes. A nivell axonal té lloc la desestructuració i fragmentació de les estructures citoplasmàtiques (citoesquelet i reticle endoplasmàtic), amb el consegüent depòsit i acumulació d'òrganuls cel·lulars (Fig. I.2.1).

Una entrada massiva de  $Ca^{2+}$  afavorida per la ruptura de la membrana axonal seria la desencadenant de la desestructuració i destrucció de proteïnes en aquest estadi postlesió (Schlaepfer 1974). Tots aquest canvis, que tenen lloc de manera preferent en fibres nervioses primes abans que en les gruixudes (Lubinska i Jastreboff 1977), van acompanyats del col·lapse i la distorsió de les beines de mielina (Schlaepfer i Bunge 1973). A les 36 hores postlesió, els axons mostren regions hipertrofiades sota la forma de varicositats i tendeixen a fragmentar-se a nivell de la regió internodal.



**Fig. I.2.1** Representació esquemàtica dels principals esdeveniments que tenen lloc durant la degeneració i la regeneració axonal després de lesions perifèriques. Després d'axotomia (B), el segment distal degenera (*degeneració walleriana*) (C), té lloc una gran proliferació de les CS mentre els macròfags migren cap al focus lesiu i fagociten material detrític. Durant la regeneració (D), els cons de creixement de l'axó creixen entre les *bandes de Büngner* de CS seguint un gradient neurotròfic i es dirigeixen cap a l'òrgan diana. Finalment (E) té lloc la reinnervació i la maduració axonal.

Al mateix temps, les CS pateixen hipertròfia i formen invaginacions cap a l'axó, fet que provoca la fragmentació de la mielina en cossos ovoïdals que posteriorment s'encarreguen de fagocitar (Selzer 1980). El resultat final és l'acumulació a l'interior dels tubs endoneurials distals a la lesió de material detrític format per la desintegració dels axons i les beines de mielina. La degradació de les restes de mielina per part dels macròfags origina àcids grassos lliures, colesterol, fosfolípids i lípids neutres en forma de gotes lipídiques en el seu citoplasma. Aquests materials seran reutilitzats posteriorment durant les fases de regeneració i remielinització axonal (Perry i Brown 1992, Goodrum i Bouldin 1996). La degeneració walleriana evoluciona en direcció proximal-distal seguint una progressió temporal que fa que l'axó sigui excitable per sota del front de degeneració fins alguns dies després de la lesió (Fu i Gordon 1997).

Els segments distals de nervi encara no afectats per la degeneració continuen mantenint activitat de transport axonal lent (Lasek 1970) i la transmissió sinàptica fins a esgotar les reserves de neurotransmisors (Feldberg 1943). La reducció dràstica de nutrients procedents del soma neuronal per transport axonal, la incapacitat de les cèl·lules glials per suplementar aquestes mancances mitjançant l'intercanvi i l'esgotament de les reserves axonals són els determinants finals de la degeneració axonal centrífuga. En qualsevol cas, la degeneració del segment distal és un requeriment indispensable per tal que tingui lloc la regeneració. Si es dirigeix la regeneració cap a un segment de nervi no degenerat, aquesta no arriba a produir-se, fet que s'atribueix a l'existència de factors inhibidors de la regeneració, com la glicoproteïna associada a la mielina (MAG), presents en el nervi normal (Fu i Gordon 1997).

Les CS es mostren capacitades per iniciar la degradació de les seves pròpies beines de mielina només 24 hores després de la lesió. En canvi, necessiten l'ajuda dels macròfags, infiltrats a partir dels 2-3 dies de la lesió, per tal d'eliminar amb eficàcia els detritus emmagatzemats a l'interior dels tubs endoneurials. La lesió nerviosa és capaç d'induir l'activació de gens temprans (IEGs) de la família c-fos de CS entre 15 i 60 minuts després de la lesió, expressió que es manté elevada durant dies. Les CS no mielinitzants assoleixen la seva taxa de màxima proliferació als 2 dies, aproximadament 24 hores abans que les CS mielinitzants. La pèrdua del contacte CS-axó no és, però, suficient per desencadenar la proliferació, que és estimulada per productes mitogènics alliberats pels macròfags infiltrants. De fet, l'associació entre una degeneració axonal retardada i defectes en la invasió de macròfags en ratolins mutants C57BL/Ola demostra l'important paper d'aquestes cèl·lules en aquest procés (Perry i Brown 1992). Productes quimiotàctics, com el factor inhibidor de la leucèmia (LIF), sintetitzats per CS reactives atrauen els macròfags fins al punt de lesió (Fig. I.2.1). Entre els 4 i els 14 dies posteriors a la lesió el nombre de macròfags assoleix el seu màxim localitzant-se en l'espai endoneurial. L'eliminació dels detritus axonals té lloc per mitjà de la secreció de proteases que permeten als macròfags penetrar a través de l'endoneuri, la membrana basal fins a accedir a l'espai endoneurial, on fagocitaran els detritus axonals que s'aniran acumulant al seu citoplasma en forma de gotes lipídiques (Stoll et al 1989). Així, durant les primeres 48 hores la fagocitosi es desenvolupa bàsicament per mitjà de les CS i posteriorment seran els macròfags els que jugaran el paper principal

(White et al 1989, Tanaka et al 1992). A més, els macròfags són una font de potents activadors (interleuquina 1, IL-1) i mitògens de les CS (PDGF: factor de creixement derivat de plaquetes, FGF: factor de creixement de fibroblastes i TGF: factor de creixement tumoral) (Reynold i Woolf 1993). Aquest conjunt de molècules estimula la desdiferenciació i la proliferació de les CS, que adquireixen una major capacitat fagocítica.

La reacció inflamatòria desencadenada per la degranulació mastocitària produeix inicialment per distensió un increment del diàmetre intern dels tubs endoneurials. Al mateix temps, l'eliminació dels axons i detritus de l'espai endoneurial deixa d'oferir resistència a les forces de retracció del teixit connectiu endoneural. Aquest balanç de forces de retracció o expansió resulta a partir de les dues setmanes de la lesió en una reducció permanent i significativa del diàmetre dels tubs endoneurials, que condicionarà l'èxit de l'elongació dels axons regeneratius (Sunderland 1991). La progressió de la degeneració walleriana varia segons la gravetat de la lesió nerviosa infringida. Així, s'ha pogut comprovar que els signes inicials de degeneració axonal apareixen abans després d'una secció que d'una compressió nerviosa (Lunn et al 1990). Tanmateix, la integritat de la barrera hematoneural es perd de manera més dramàtica en lesions per secció que per compressió (Lunn et al 1990). L'increment de permeabilitat vascular dels nervis degenerats es desplaça en sentit proximal a distal, de manera coincident amb la degeneració i la infiltració de macròfags. Una major invasió del nervis seccionats per macròfags i substàncies citotòxiques de procedència vascular respecte de lesions per compressió podria explicar la major rapidesa de degeneració (Lunn et al 1990). Els fenòmens de degeneració també presenten variacions segons el tipus de fibres nervioses lesionades. Les fibres gruixudes semblen presentar una major resistència a la degeneració axonal que les primes. D'aquesta manera, mentre en axons mielínics la degeneració walleriana completa no té lloc fins als 14 dies postlesió (Stoll et al 1989), els axons amielínics degeneren totalment durant la primera setmana (Thomas i King 1974).

## 2.2. Degeneració retrògrada

Després de la lesió del nervi es produeix també una degeneració retrògrada del segment proximal des del punt de lesió (Cajal 1928), que s'ha associat amb l'entrada de  $Ca^{2+}$  i la consegüent activació de proteases (Bisby et al 1995). La degeneració retrògrada afecta un segment d'alguns mil·límetres, constituiria una extensió en direcció proximal dels canvis que ja tenen lloc a nivell distal i seria només remarcable quan la lesió produeix nivells importants de mort neuronal (Sunderland 1991). La supervivència neuronal i la capacitat per emetre brots regeneratius serien els principals determinants del grau de degeneració retrògrada després de lesions. Els axons supervivents mostren una reducció del diàmetre axonal i de la beina de mielina, que es recupera parcialment amb la regeneració i la reinnervació (Sunderland 1991). Aquests canvis, que afecten més marcadament els axons sensorials que els motors, van acompanyats d'una reducció de la taxa de transport axonal. La quantitat de neurotransmissors i precursors transportats disminueix dràsticament als pocs dies fins al punt que es fa impossible la seva detecció (Frizell i Sjöstrand 1974), sent aquesta reducció més ràpida i important després de la secció que de la compressió del nervi (O'Brien 1978, Karlström i Dahlström

1973). La disminució de l'expressió i del transport axonal de neurofilaments i tubulina explicaria la reducció de diàmetre i de la velocitat de conducció d'impulsos en axons lesionats distalment (Hoffman i Lasek 1980, Bisby et al 1995). Aquests canvis en el tamany de les fibres nervioses només es manifestaran com una reducció significativa de les dimensions del nervi en cas que es produeixi la mort d'un nombre considerable de neurones (Sunderland 1991).

### 2.3 Reacció neuronal i cromatòlisi

La lesió de la fibra nerviosa i la degeneració walleriana alteren també la morfologia i el funcionament normal de la neurona a nivell del seu soma. Aquestes transformacions són l'expressió d'una sèrie de canvis moleculars de la neurona que, com a conseqüència de la lesió, passa d'un estat homeostàtic de "transmissió", en el qual la seva funció principal és la de conduir senyals bioelèctrics i produir neurotransmissors, a un estat de "creixement" en el que ha de dedicar tots l'activitat metabòlica a la regeneració del seu axó i la reinnervació de dianes perifèriques (Gordon 1983, Fu i Gordon 1997). La cromatòlisi consisteix en la dissolució dels cossos de Nissl, l'augment de les dimensions del nucli i dels nuclèols, la disposició excèntrica del nucli i l'increment de volum del soma (Kreutzberg 1995). També es pot produir un augment del nombre de lisosomes, hipertròfia de l'aparell de Golgi i les mitocòndries i vacuolització d'altres orgànuls citoplasmàtics (Lieberman 1971). La dissolució dels ribosomes i del reticle endoplàsmic rugós, que constitueixen els cossos de Nissl, en polirribosomes i ribonucleòtids, indica un increment de la traducció i la síntesi de proteïnes (Cragg 1970). En paral·lel a aquests canvis estructurals, la neurona axotomitzada presenta importants canvis bioquímics, com un increment d'enzims del cicle de les pentoses-fosfat, necessàries per a la síntesi de precursors de polinucleòtids i lípids (Härkönen i Kauffman 1974), la disminució de la síntesi de neurotransmissors (Heiwell et al 1979) i de proteïnes constituents del citoesquelet (Hoffman i Lasek 1980). Existeix una relació entre la gravetat de la lesió infringingida i el grau de cromatòlisi (Marinesco 1896), encara que també se sap que aquest procés no és imprescindible per a la regeneració i, així, s'ha descrit regeneració en neurones del gangli de l'arrel dorsal que presenten una reacció cromatolítica escassa (Greenberg i Lasek 1988).

Paral·lelament s'observa també una retracció de l'arbre dendrític de la neurona axotomitzada i una reducció del nombre de sinapsis que estableix amb neurones veïnes (Sumner 1975, Brannström et al 1994a, 1994b). Així, s'ha observat un descens de l'amplitud dels potencials d'acció evocats en motoneurons axotomitzades (Eccles et al 1958, Kuno i Llinás 1970, Mendell et al 1976, Farel 1980), que es tradueix en un descens de les descàrregues sinàptiques durant el primer mes després de l'axotomia (Gordon et al 1980). Altres autors han definit tres estadis de disfunció sinàptica després de lesions: una primera fase durant la qual no s'observa reducció de l'amplitud dels potencials postsinàptics excitatoris (PEPS), una segona fase en què es detecta una reducció de l'amplitud i un allargament de la latència i, finalment, la desaparició dels PEPS (Mendell et al 1976). Un procés semblant ha estat observat també en neurones del gangli simpàtic (Sumner 1975, Brännstrom et al 1992a, 1992b). La interposició de digitacions de cèl·lules d'astròglia i micròglia que s'han activat i proliferat abundantment després de la lesió semblen les responsables d'aquest

aïllament (Kreutzberg 1995). Aquesta situació és, però, reversible si l'axó és capaç de regenerar i reinervar un territori diana (Sumner i Watson 1971). Així s'assegura l'aïllament funcional del circuit nerviós lesionat i inoperant de la resta de circuits neuronals actius (Mathews i Nelson 1975, Purves 1975, Sumner i Sunderland 1973).

L'entrada massiva de  $Ca^{2+}$  a l'axoplasma durant els primers segons després de la lesió i la supressió del transport axonal retrògrad de factors tròfics, desencadena l'expressió d'IEGs membres de la família jun, jun B i c-jun (Lunn et al 1990, Haas et al 1993). L'activació d'aquests IEGs implica l'expressió de proteïnes que regulen els anomenats gens de resposta tardana (*late response genes*, LRGs), l'expressió dels quals determina en darrera instància els canvis bioquímics, morfològics i fisiològics constitutius de la resposta neuronal. Les característiques de l'expressió gènica i la transcripció proteica de gens temprans, neurotransmissors i factors de creixement són consistents amb el canvi d'estat de la neurona lesionada, encara que la simple associació temporal d'aquests canvis d'expressió amb la regeneració no sempre indica que es tracta de molècules relacionades i essencials (Fu i Gordon 1997). Així, en motoneurons axotomitzades es troba un increment de l'expressió dels gens temprans jun B i c-jun que podrien actuar com a senyalitzadors, la disminució de l'expressió de la colin-acetiltransferasa (CAT), mentre que al mateix temps està incrementada l'expressió del pèptid relacionat amb el gen de la calcitonina (CGRP), la proteïna associada al creixement (GAP-43) i les proteïnes del citoesquelet actina i tubulina (Friedmann et al 1995). L'increment de l'expressió d'una molècula immediatament després de la lesió i la involució progressiva amb la reinnervació perifèrica, com és el cas de GAP-43, CGRP i isoformes de tubulina indiquen el seu possible paper en la resposta neuronal. Així, la GAP-43 és una fosfoproteïna que s'expressa en neurones regeneratives, situant-se a la membrana dels cons de creixement. Sembla ser un element determinant per a l'extensió de neurites *in vitro*. Hi ha també una relació estreta entre el component b del transport axonal lent, en el qual participen actina i tubulina, i la taxa d'elongació axonal. Encara que l'axotomia s'associa en general amb una disminució de l'expressió de neurotransmissors i dels seus enzims de síntesi i degradació, hi ha alguns neuropèptids l'expressió dels quals s'incrementa, de manera que, en determinades neurones, contribuirien a la supervivència axonal i la regeneració, la vascularització i l'increment de permeabilitat vascular o tindrien activitat neurotròfica a través de la seva activitat mitogènica de cèl·lules glials (Fu i Gordon 1997). L'expressió de CGRP està incrementada paral·lelament a la reducció de la de CAT en motoneurons (Haas et al 1990). En neurones simpàtiques s'incrementa l'expressió del pèptid intestinal vasoactiu (VIP), galanina (GAL) i substància P (SP) i disminueix la dels enzims de síntesi de noradrenalina i neuropèptid Y (NPY) com a resposta a l'acció del LIF. En neurones sensorials del gangli de l'arrel dorsal, els neuropèptids subatància P (SP), CGRP i somatostatina (SOM) estan regulats negativament mentre que l'expressió de VIP, GAL, neuropèptid Y (NPY) i colecistoquinina (CCK) està incrementada (Zigmond et al 1997). Les neurones axotomitzades també sintetitzen i alliberen diverses citoquines, que, sinèrgicament amb les citoquines alliberades per macròfags i CS, contribueixen a produir la resposta inflamatòria, tenen efectes mitogènics sobre les CS i modulen el dipòsit de proteïnes de la matriu extracel·lular (Mews i Meyer 1993).



#### 2.4. Canvis de la glia central

L'axotomia perifèrica de motoneurons ha constituït el model bàsic d'estudi de les reaccions gials espinals davant la lesió. Un dia després de l'axotomia s'observa un increment de la síntesi i expressió de la proteïna àcida fibril·lar glial (GFAP) en astròcits (Tetzlaff et al 1988, Graeber i Kreutzberg 1986). Posteriorment, incrementen el nombre de filaments i emeten processos cel·lulars que cobreixen regions no sinàptiques de la motoneurona (Svensson 1994). Dies després l'expressió de GFAP disminueix, per tornar a augmentar al cap d'unes setmanes. Si s'impedeix la reinnervació de dianes musculars, s'observa que els astròcits mantenen l'embolcallament de la motoneurona afecta durant bastant de temps (Sumner 1977, Graeber i Kreutzberg 1988). També s'ha observat un increment de l'expressió d'un conjunt de glicoproteïnes multifuncionals que tenen capacitat per inhibir la lisi neuronal mediada per factors de complement, participen en fenòmens d'adhesió cel·lular, transport de lípids i d'altres processos relacionats amb la supervivència neuronal (Rosenberg i Silknesen 1995), així com de PDGF i del seu receptor en astròcits reactius (Hermanson et al 1995). Finalment, s'ha demostrat que els astròcits reactius expressen una subunitat del receptor de N-metil-D-Aspartat (NMDA) (Popratiloff et al 1996) relacionada amb una necessitat d'incrementar la recaptació de glutamat o d'altres agonistes alliberats al medi després de lesions perifèriques.

Als pocs dies de la lesió, l'increment de l'expressió d'un receptor del sistema de complement (CR3) posa de manifest l'activació de la micròglia (Graeber et al 1988). A les 24 hores de la lesió, aquestes cèl·lules sofreixen una retracció dels seus processos, augmenten de mida i inicien la seva proliferació per mitosis. Als 7 dies, ja no s'observa proliferació de micròglia (Svensson et al 1994), encara que la reacció glial és persistent en el temps, especialment si no es produeix la reinnervació perifèrica per part d'axons regeneratius (Sumner 1979). La micròglia migra i se situa també a l'entorn de les neurones axotomitzades, procés que només és relevant quan la lesió comporta una pèrdua axonal important (Cova i Adskogius 1986), encara que les membranes neuronal i microglial estan sempre separades per la interposició de processos astrocitaris (Svensson i Aldskogius 1993). La micròglia expressa una sèrie de proteïnes de superfície i un increment de la unió de molècules com l'antigen de funció leucocitària (LFA-1 $\alpha$  i  $\beta$ ) que posa de manifest un increment de la motilitat microglial (Moneta et al 1993), el factor estimulador de granulòcits i macròfags (GNCSF) i el factor estimulador de colònies de macròfags (MCSF) que regularia la mitosi d'aquestes cèl·lules (Raivich et al 1991). També s'indueix l'expressió d'antígens del complex major d'histocompatibilitat I i II (MCH-I/II) i, el sistema del complement presenta importants modificacions, destacant l'increment de l'expressió del receptor CR3, dels factors C1 i C1q i la inducció dels factors C3, C3d, C4d i C9 (Svensson i Aldskogius 1992, Walport 1993). En situacions de mort neuronal, les cèl·lules de micròglia actuen com a macròfags, especialment en animals neonatals, fent ús de totes aquestes eines de reconeixement immunològic i destrucció cel·lular (Guntinas-Lichius et al 1994, Angelov et al 1995).

Amb la lesió de l'axó perifèric, es registren en elements de la via sensorial, reaccions molt semblants a nivell dels ganglis de les arrels dorsals. La reacció neuronal i glial té tendència a estendre's cap als processos centrals, incloent també les terminals i axons en la banya posterior de la medul·la espinal. Aquestes transformacions han estat denominats canvis transganglionars (Adskogius et al 1992) i consisteixen en degeneració dels axons centrals, canvis moleculars de pèptids i proteïnes associades al creixement, col·lateralització i alteracions de la transmissió sinàptica (Hököfelt 1994, Woolf i Doubell 1994). Poc temps després de la lesió dels axons de neurones sensorials hi ha una expressió incrementada de GFAP, indicativa de la hipertròfia astrocitària, que no es pot prevenir amb l'aplicació del factor de creixement neural (NGF) en l'axó seccionat (Eriksson et al 1997). S'ha observat l'embolcallament de terminals neuronals per cèl·lules de l'astròglia sense acció fagocítica (Persson et al 1991). Cèl·lules de la micròglia resident comencen a acumular-se entre les 24 i 48 hores posteriors a la lesió en les àrees de projecció de la neurona sensorial (Persson et al 1995, Melzer et al 1997).

La intensitat i durada de les respostes astroglials i microglials són proporcionals a la gravetat de la lesió. Si bé es pot explicar que en animals neonatals, en què la mort neuronal post-axotomia és important, la proliferació microglial i la resposta astrogliar està destinada a l'eliminació de les restes neuronals, no s'explica massa bé el seu paper en subjectes adults. En aquest cas, les respostes glials estarien destinades a afavorir la supervivència i la recuperació metabòlica de la neurona i, posteriorment, a afavorir la regeneració axonal. Al mateix temps, l'astròglia estaria directament implicada en l'aïllament de les terminals sinàptiques espinals de les neurones afectades (Shortland i Woolf 1993, Blizinger i Kreutzberg 1996). Aplicant un factor antimitòtic (ARA-C) s'ha demostrat que, malgrat l'eliminació de gairebé la totalitat de la micròglia espinal, la resposta neuronal, el grau de creixement axonal i reinnervació de dïanes, així com els fenòmens d'aïllament sinàptic es produeixen igualment (Svensson i Aldskogius 1993). De manera paral·lela, s'ha observat que la supressió de la proliferació microglial coincideix amb l'anul·lació de l'increment de l'expressió de GFAP després de lesions axonals. Aquest fet indica que la hipertròfia dels astròcits tampoc és un requisit indispensable per a la supervivència neuronal, la regeneració axonal i l'aïllament sinàptic (Svensson et al 1993). És probable que les cèl·lules de la micròglia no intervinguin en el manteniment i suport de la neurona axotomitzada i, per contra, juguin un paper en l'eliminació de restes en degeneració i en la remodelació axonal després de lesions perifèriques (Aldskogius i Kozlova 1997).

## **2.5. Regeneració axonal**

Com a resultat de l'elasticitat del teixit connectiu del nervi, immediatament després de la lesió, s'observa una retracció que tendeix a generar un espai interneural i dificulta en alguns casos la reparació per sutura directa. En la zona de lesió es desencadena una reacció inflamatòria amb extravasació de plasma sanguini procedent dels capil·lars seccionats i acumulació d'exsudat entre ambdós caps del nervi. La proliferació dels fibroblastes per tal de conformar en el punt de lesió una nova estructura endoneural constitueix, a la zona de secció, una massa cicatricial conformada per filaments de col·lagen amb vasos sanguinis, fibroblastes, CS i macròfags. La probabilitat que es

generi un neuroma a l'extrem nerviós augmenta en lesions no reparades, de manera que aquesta massa fibrosa es transforma en un obstacle per a la regeneració (Sunderland 1991).

Paral·lelament a la preparació del soma neuronal per a la síntesi de components estructurals del citoesquelet i la membrana, els segments proximals dels axons supervivents generen cons de creixement. Aquests brots neurals que semblen aparèixer no com a fenòmens induïts pel soma neuronal, sinó més aviat per senyals procedents de l'entorn local (Kato i Ide 1994), es fan presents a les poques hores d'haver-se produït la lesió. Aquestes estructures "naveguen" distalment en contacte amb les bandes de Büngner, formades per les CS alineades a l'entorn del teixit connectiu, i la làmina basal dels tubs endoneurals (Selzer 1980) (Fig. I.2.1). Les CS del segment nerviós distal, i molt especialment, la subpoblació de les no mielinitzants proliferen a l'interior de la làmina basal dels tubs endoneurals durant els primers dies postlesió, formant les anomenades bandes de Büngner, (Ramon y Cajal 1928, Bunge 1987). A l'interior d'aquests canals, les CS generen un gradient de factors neurotròfics i una membrana basal o matriu extracel·lular rica en elements promotors del creixement axonal, que guien els cons de creixement fins als òrgans diana denervats. L'entitat derivada de la interacció entre la membrana basal de les CS i els cons de creixement axonals és el que s'anomena unitat regenerativa (Fawcett i Keynes 1990). Cada axó acostuma a generar entre 50 i 100 branques amb diversos cons de creixement que penetren a l'atzar en alguns dels tubs endoneurals i creixen envoltats de les CS i llur membrana basal (Ramon y Cajal 1919). La velocitat d'elongació axonal vers el segment distal és de l'ordre de 2-4 mm/dia en espècies de rosegadors i d'1mm/dia aproximadament en humans (Lundborg 1988, Bisby 1995). En absència però de segment distal, és freqüent la formació d'un neuroma a l'extrem del nervi conformat per teixit connectiu i fibres nervioses immadures que bloqueja la regeneració distal, al mateix temps que és una font d'estimulació mecànica per contacte de les terminals axonals (Sunderland 1978, Devor et al 1989).

En aquest context, hi ha tres fenòmens bàsics que condicionen l'èxit de la regeneració axonal: en primer lloc la producció tant a nivell central com perifèric de factors neurotròfics que afavoreixin la supervivència de les neurones lesionades; en segon lloc la proliferació local de cèl·lules no neuronals que mitjançant l'alliberament de substàncies d'efecte neurotròfic, neuritogènica i neuritotrófica conegut, promouen específicament la regeneració; finalment i sobre la base d'aquest suport molecular, s'ha de produir l'elongació axonal a través dels tubs endoneurals.

### *2.5.1 Supervivència neuronal i molècules neurotròfiques*

En condicions fisiològiques, la supervivència i el manteniment de neurones perifèriques depen de la capacitat de síntesi i alliberament de factors tròfics per teixits i cèl·lules no neuronals situades a l'entorn del soma o l'axó de la neurona afectada. A nivell perifèric, després d'una lesió nerviosa s'incrementa notablement l'expressió d'aquests factors especialment en les CS, els fibroblasts endoneurals i els macròfags infiltrats. Aquests tipus cel·lulars secreten, entre altres, pèptids de la família de les neurotrofines (NGF, BDNF, NT3 i NT4/5), factors àcid i bàsic de creixement de fibroblastes (b-FGF, a-FGF), citoquines (CNTF, IL-1, IL6, TNF- $\alpha$  i LIF), factors de creixement

tipus insulina (IGF-I i III), factors derivats de cèl·lules glials (GDNF), herregulines (NDF i GGF) i d'altres (PDGF i EGF) (Liu 1996, Fu i Gordon 1997). Alguns d'aquests factors tenen efectes específics sobre determinats tipus neuronals, d'altres són actius biològicament en més d'un tipus de neurona i, finalment, d'altres presenten un ampli espectre d'activitats neurotròfiques i mitogèniques. Així, el bFGF, al mateix temps que té activitat inductora de la mitogènesi de les CS, col·labora al manteniment de la supervivència de neurones motores, sensorials i autonòmiques simpàtiques. Receptors específics localitzats als cons de creixement activen mitjançant la interacció amb factors tròfics missatgers intracel·lulars que internalitzen aquestes molècules i les retrotransporten fins al soma on expressen efectes inductors de la supervivència i la regeneració.

Per la seva banda, també les mateixes neurones lesionades sintetitzen i alliberen diferents molècules neurotròfiques, entre elles les ja esmentades NGF, BDNF, NT3, aFGF, PDGF i GGF (Kobayashi et al 1996, Marchioni et al 1993), que tenen efectes autocrins i paracrins sobre cèl·lules neuronals i efectes mitogènics sobre cèl·lules no neuronals (Verge et al 1996). L'expressió neuronal de receptors per factors tròfics està incrementada en algunes, però no totes les neurones afectades. Així el trkB i el p75 s'incrementen en motoneurones lesionades (Friedmann et al 1995, Raivich i Kreutzberg 1993), però disminueixen en neurones del gangli de l'arrel dorsal. Aquest augment transitori permetria a les motoneurones acumular factors neurotròfics alliberats per la glia del seu entorn o bé facilitar el transport retrògrad de neurotrofines des de l'axó (Curtis et al 1994). Per contra, la disminució paradoxal dels receptors d'alta i baixa afinitat per a neurotrofines en neurones sensorials sembla que permetria regular internament els nivells de factors tròfics endògens, per tal de mantenir-los per sota del llindar a partir del qual la neurona torna al seu fenotip normal de "transmissió", però encara suficient com per promoure la supervivència neuronal i el manteniment dels cons de creixement (Fu i Gordon 1997).

### 2.5.2 Proliferació de cèl·lules no neuronals: les CS

Un segon factor important per la regeneració és la proliferació de cèl·lules no neuronals responsables de generar el microambient idoni per al creixement axonal a l'extrem denervat. De tots els elements implicats la CS té el paper principal, ja que s'encarrega de generar el substrat tròfic i tròpic que ha de servir de suport, guia i estímul molecular dels axons que s'elonguen dins dels tubs endoneurals. Després de l'axotomia, les CS incrementen l'expressió de factors tròfics i dels seus receptors corresponents. Alguns d'ells indueixen la proliferació d'altres tipus cel·lulars com els fibroblastes (bFGF i PDGF) o bé presenten efectes quimiotàctics afavorint la migració de macròfags (LIF). El resultat final és l'increment de la varietat i quantitat de factors mitogènics disponibles que activen la proliferació de CS o derivats de macròfags (IL-1 i TGF). La població de CS al nervi degenerat multiplica per quatre el seu número i arriba a representar el 70% del total de la població cel·lular (Salonen et al 1988). Aquest component cel·lular és el responsable de generar una làmina basal i una matriu extracel·lular amb activitat neuritogènica i neuritròpica que inclou com a principals components fibronectina, laminina, vitronectina, col·làgen tipus I, II i IV, proteoglicans i tenascina C (Reichardt i Tomaselli 1991, Liu 1996), i també molècules d'adhesió cel·lular com L1 i NCAMs

(Kuecherer-Ehret et al 1990). Un segon mecanisme afavoridor de la regeneració axonal és la unió de factors neurotròfics a receptors de la membrana de la CS, l'expressió dels quals ha augmentat considerablement després de la lesió, com és el cas del receptor de baixa afinitat per a NGF, p75. La seva expressió s'incrementa dràsticament després de la denervació amb la funció d'unir NGF i actuar com un substrat neurotròfic per a l'axó regeneratiu. L'NGF unit als receptors de membrana de les CS, en interaccionar amb el receptor tirosinaquinasa de la superfície de membrana dels cons de creixement, és captat, internalitzat i transportat retrògradament fins al soma neuronal.

Al mateix temps, es redueix a les CS l'expressió d'altres gens que codifiquen components de la mielina i dels factors CNTF (factor neurotròfic cil·liar) i GFAP (Sendtner et al 1992). La CS també incrementa immediatament després de lesió l'expressió de IL-6 que té activitat neurotròfica i de manteniment de la pròpia cèl·lula per via autocrina. Per altra banda, l'activitat dels macròfags contribueix directament a la regeneració nerviosa mitjançant l'eliminació directa de substàncies inhibidores associades a la mielina i per mitjà d'una àmplia gama de factors que són importants per la reparació cel·lular. Els macròfags alliberen també mitògens per a les CS i fibroblastes, citoquines que estimulen la síntesi de factors de creixement i molècules d'adhesió en cèl·lules no neurals del tub endoneurial i cèl·lules endotelials.

### *2.5.3 Elongació dels axons regeneratius*

El tercer element fonamental de la regeneració és l'elongació de l'axó supervivent. Els cons de creixement presenten una regió perifèrica i una regió central o cos que actua com a centre d'ancoratge de la membrana plasmàtica i del citoesquelet, que s'encarrega de consolidar l'axó regeneratiu. En aquesta regió és característica la presència d'una acumulació de vesícules i la polimerització de noves unitats de tubulina que possibilita bé l'allargament dels microtúbuls existents o bé la formació de nous (Bray 1992). El segment perifèric emet unes extensions citoplasmàtiques anomenades filopodis i lamel·lipodis, plenes de filaments intermitjos i proteïnes contràctils com l'actina i la miosina (Letorneau i Shattuck 1989, Bamberg et al 1992, Bridgman 1992) que actuen com a òrgans "exploradors" del territori que els cons de creixement es disposen a travessar. La progressió de l'allargament dels cons de creixement es produeix gràcies a l'ancoratge dels filopodis a molècules del substrat tròpic de la matriu extracel·lular a través d'una població de receptors per a molècules d'adhesió específiques com les integrines o les NCAMs situades en la seva membrana (Letorneau i Shattuck 1989). Aquesta interacció permet a les proteïnes contràctils dels filopodis estirar el con de creixement i fer avançar el cos central. La presència d'ions calci i proteïnes quinases fan possible l'estabilització del citoesquelet format en fosforilar els monòmers de tubulina i les seves proteïnes associades, anomenades MAPs. Així doncs, la producció d'un entorn regeneratiu adequat amb una làmina basal o matriu extracel·lular rica en elements neurotròfics i neurotròpics gràcies a les CS és un fet determinant per a poder produir una elongació ràpida i eficaç.

### 3. Denervació i reinnervació d'òrgans diana

#### 3.1. Canvis en els òrgans diana denervats

La lesió axonal desconnecta la neurona dels òrgans diana distals. La desaparició d'aquesta relació, a través de la qual la cèl·lula nerviosa es nodreix de factors tròfics procedents dels teixits perifèrics, també afecta a les cèl·lules diana. No totes les cèl·lules diana, en músculs, pell i dianes autonòmiques són, però, igualment sensibles ni es comporten igual davant la denervació.

##### 3.1.1 Múscul esquelètic

Els estudis de denervació han demostrat que la innervació muscular és essencial per al manteniment de l'estructura, l'activitat metabòlica, les característiques immunohistoquímiques i la integritat de les fibres musculars i el múscul. El múscul és capaç de sobreviure a la denervació durant llarg temps, encara que pot patir tres tipus de processos: atrofia, fibrosi i contractura. Durant el primer mes de denervació l'atrofia és el fenomen predominant. La pèrdua d'innervació i la manca d'activitat produeix una caiguda significativa del seu volum i pes, especialment durant els primers mesos d'inactivitat (Sunderland 1991). No totes les fibres musculars resulten uniformement afectades, fet que fa variar l'estat muscular d'una regió a una altra. Les fibres musculars presenten una reducció de volum per la pèrdua de sarcoplasma, que es quantifica en una reducció del 70% del seu diàmetre als 60 dies de la lesió. La pèrdua de pes que experimenta per l'atrofia de les fibres musculars es compensa parcialment per la proliferació de teixit connectiu. Temps després de la denervació, les fibres musculars presenten una placa motora identificable, encara que aquesta perd la seva morfologia característica i és, per tant, més difícil de detectar. Les fibres intrafusals semblen afectar-se en menor grau que les extrafusals; s'ha pogut identificar en material histològic d'humans la presència de fusos musculars fins als 16 mesos de denervació. La denervació produeix un engruiximent de l'epimisi, el perimisi i l'endomisi que envolten les fibres musculars. Entre el segon i el tercer mes de denervació es comença a observar un increment del nombre de fibroblastes i del gruix del perimisi i l'endomisi. Al final del tercer mes l'atrofia de les fibres és tan evident que aquestes queden separades per amplis espais extracel·lulars. A partir dels 12 mesos de denervació i en casos d'atrofia extrema, els canvis experimentats per la massa muscular esdevenen irreversibles i la fibra muscular s'oblitera. Posteriorment es fragmenta el nucli i el sarcoplasma adquireix una morfologia "arrossariada". Finalment la cèl·lula es vacuolitza, es trenca la membrana del sarcolema i la fibra es fragmenta. L'àrea afectada és envaïda aleshores per macròfags que eliminen els detritus resultants. En aquests casos, fibres de teixit connectiu i fibroblasts conjuntament amb adipòcits substitueixen les fibres musculars perdudes. La degeneració muscular i la fibrosi acaben generalitzant-se a tota la massa muscular (Sunderland 1991). La immobilització de l'extremitat denervada o el predomini del to muscular dels grups antagonistes als denervats produeixen una redistribució del balanç de forces sobre l'articulació.

L'afectació muscular resultant de la denervació es pot explicar per la desaparició de l'acció tròfica que determinades substàncies alliberades per la terminal axònica tenen sobre la fibra muscular. D'altra banda, l'engruiximent de la paret capil·lar, l'acumulació de col·lagen en l'espai intersticial o canvis de

l'estructura del sarcolema podrien dificultar la transferència de nutrients des dels vasos fins a les fibres del múscul denervat. La paràlisi vasoconstrictora i la immobilització causada per la paràlisi, que elimina la bomba muscular com a mecanisme per afavorir el retorn venós, afavoreixen l'èstasi linfàtica i venosa i són factors addicionals que expliquen una irrigació insuficient del múscul denervat parcialment o totalment (Sunderland 1991).

### 3.1.2 Receptors sensorials i pell

Diferents tipus de lesions nervioses centrals i perifèriques (secció del nervi, resecció del gangli de l'arrel dorsal, rizotomia i bloqueig amb toxina botulínica de la musculatura) produeixen una disminució en diferents graus del gruix de l'epidermis en llurs regions de projecció (Li et al 1997). La desaparició de l'efecte tròfic continuat de productes com el CGRP, alliberats per les terminals nervioses sensorials sobre els estrats epidèrmics explica l'atròfia cutània per lesions sensorials. En el cas de lesions motores on es mantenen les terminals sensorials, la pèrdua d'estímuls del pes de l'animal per la manca d'ús dels músculs denervats i la interferència per part d'axons motors dels processos de transport de factors neurotròfics en axons sensorials veïns justifiquen la majoria de canvis (Li et al 1997). De manera paradoxal, la simpatectomia no desencadena un aprimament epidèrmic amb la denervació, fet que es pot relacionar amb un increment de la immunoreactivitat de CGRP i VIP en la pell després d'aquestes lesions (Li et al 1997). La denervació continuada també posa de manifest un increment de l'expressió del neuropèptid estructural PGP 9.5 (una ubiquitina neuronal) en cèl·lules de Langerhans (cèl·lules presentadores de CMH tipus I i II a la pell) que desapareix amb la reinnervació (Hsieh et al 1996). Aquestes cèl·lules són font de producció de citoquines, que podrien tenir també una acció tròfica sobre els queratinòcits de l'epidermis.

Estudis immunohistoquímics demostren que la reactivitat al PGP 9.5 que marca tota mena de fibres nervioses desapareix lentament a mesura que té lloc la degeneració walleriana. Als 16 dies d'una compressió s'observa l'arribada a la dermis dels primers perfils regeneratius que penetraran posteriorment a la epidermis i que corresponen a terminacions lliures de nociceptors i termoreceptors. A diferència del patró normal d'innervació, i malgrat que proves funcionals paral·leles mostren una recuperació de la resposta a l'estimulació dolorosa, les terminals formen una xarxa de terminacions epidèrmiques reduïda i poques arriben a les capes més superficials (Verdú i Navarro 1997, Navarro et al 1997). Així s'observa una densitat de fibres per àrea epidèrmica i un nombre de perfils intraepidèrmics clarament disminuïts (Verdú i Navarro 1997)

Els receptors sensorials cutanis encapsulats depenen de la innervació sensorial per a desenvolupar-se i mantenir-se (Zelená 1976). Les terminals sensorials dels corpuscles cutanis estan embolicades per CS terminals i els seus processos citoplàsmics sustentats també en la membrana basal (Ide 1986). La denervació sensorial en fases postnatales (fins als 5 dies postnatales en la rata) produeix una degeneració d'aquestes formacions i les seves estructures adjacents. En aquesta etapa, la reinnervació per axons regeneratius indueix la neoformació de terminacions especialitzades encara que estructuralment atípiques. En animals adults sotmesos a compressió del nervi ciàtic, el *core*, la

càpsula i les estructures auxiliars sobreviuen a la lesió i poden ser reinnervades (Ide 1982). Per contra, la denervació continuada produeix l'atròfia de les CS terminals i un increment de col·lagen. Se sap que en períodes de fins a 14 mesos de denervació, les CS terminals persisteixen i contribueixen al manteniment de la formació sensorial i a la seva reinnervació (Ide 1982, Zelená 1984). Al mateix temps, la denervació produeix la desaparició de molècules d'acetilcolina esterasa no específica que normalment és sintetitzada al reticle endoplàsmic rugós de les CS terminals i alliberada a l'espai extracel·lular. Aquesta disminució és deguda tant a la desaparició de l'efecte tròfic de la innervació, com a l'atròfia de la pròpia formació terminal i les CS del seu entorn (Dubovy i Aldskogius 1995).

Els corpuscles de Paccini són resistents a la denervació, encara que una vegada reinnervats mostren una morfologia particular. Així, mentre que en la pell innervada, les terminals axonals s'acostumen a dividir en múltiples branques aixoplugades sobre una mateixa estructura de cèl·lules corpusculars, els corpuscles de Paccini reinnervats mostren un *core* individual i separat per cadascuna de les branques nervioses i una estructura morfològicament molt diferent (Zelená 1984, Munger 1988). La morfologia dels corpuscles de Meissner no es modifica excessivament en animals adults per la lesió i la reinnervació mantenint fines lamel·les i axons de gran diàmetre al seu interior, encara que amb una disposició distorsionada. S'observa però que ocupen una posició més profunda a les papil·les dèrmiques que els seus corresponents originals i es troben sovint envoltades de corpuscles de Meissner atròfics no reinnervats caracteritzats com a agregats cel·lulars i làmina basal (Munger 1988, Verdú i Navarro 1997). En quant a les cèl·lules de Merkel, situades a l'epidermis basal i innervades per axons tipus A $\beta$ , després d'una compressió o secció nerviosa es produeix la pèrdua d'un 60% de la població, mentre que el 40% restant sobreviuen de manera independent (Nurse et al 1984, Dubovy i Aldskogius 1995). A les 3-5 setmanes s'observa una progressiva recuperació del nombre de cèl·lules per l'arribada d'axons regeneratius deguda a la diferenciació de noves cèl·lules de Merkel probablement induïda per la innervació (Nurse et al 1984). Pel que fa a la seva morfologia, després de la denervació, mostren un aspecte histològic molt semblant a l'original, encara que alguns registres electrofisiològics posen de manifest una reinnervació per un nombre de col·laterals nervioses menor (Nurse et al 1984). Des del punt de vista funcional s'ha demostrat que la reinnervació genera camps mecanoreceptors més amplis i solapats que els originals. Al mateix temps, una elevada proporció d'aquest receptors mostra electrofisiològicament una pèrdua de la seva capacitat per actuar com a receptors d'adaptació lenta, amb una atenuació ràpida de la seva freqüència de despolarització davant d'un estímul tàctil fi (Nurse et al 1984).

### 3.1.3 *Dianes del sistema nerviós autònom*

Les glàndules sudorípares (GS) mostren amb la denervació postganglionar un procés de desensibilització a l'acció d'agents colinèrgics, constituint una excepció a la llei de Cannon (Cannon 1939, Kennedy i Sakuta 1984) segons la qual la denervació produeix una hipersensibilització de receptors perifèrics a l'acció d'activitat o molècules agonistes. No s'han observat canvis en la densitat i la distribució de receptors muscarínics de les GS denervades ni cap alteració del subtipus de receptor o alteració de la afinitat pels seus agonistes (Grant et al 1991). Tampoc s'han demostrat



alteracions produïdes per la denervació sobre el sistema d'acoblament de la proteïna G al metabolisme del fosfatidilinositol, raó per la qual es pensa que la desensibilització és deguda a la manca d'alliberament des de la terminal axonal d'una o diverses proteïnes que regularien la funció dels canals de  $\text{Cl}^-$  i  $\text{K}^+$  (Grant i Landis 1991). Des del punt de vista estructural, la denervació traumàtica o tòxica comporta una pèrdua de la innervació de la GS per part de perfils immunoreactius a PGP 9.5, CGRP i VIP, mentre que la seva estructura histològica es manté intacta i no experimenta canvis (Kennedy et al 1990, Verdú et al 1998).

Per contra, els vasos sanguinis que reben innervació autonòmica dels fascicles nerviosos afectats mostren fenòmens d'hipersensibilitat a la denervació i reaccionen amb una vasoconstricció reactiva que, si bé en primera instància permet mantenir un cert nivell de pressió arterial muscular, al mateix temps produeix un dèficit d'irrigació de l'extremitat afectada (Sunderland 1991). Alguns autors assenyalen la paràlisi vasoconstrictora com un dels elements que participen en provocar fenòmens d'atròfia muscular i cutània postdenervació (Sunderland 1991).

### 3.2. Reinnervació perifèrica

La reinnervació dels òrgans diana distals que han quedat denervats per la lesió i la posterior maduració dels axons regeneratius una vegada ja ha tingut lloc la reinnervació es consideren les fases finals del procés de regeneració nerviosa. Una sèrie complexa de senyals bidireccionals establerts entre axons regeneratius i òrgans diana perifèrics regula la reinnervació. Així, en la reinnervació muscular, l'increment de la síntesi i l'alliberament d'IGF per part dels miòcits denervats, que es normalitza en produir-se el contacte neurona-fibra muscular i la neoformació de la sinapsis, afavoreixen el restabliment de les connexions neuromusculars (Glazner i Ishii 1995). Al mateix temps, les motoneurons i les pròpies fibres musculars alliberen agrina, un polipèptid que s'uneix al seu receptor del sarcoplasma de les fibres musculars denervades i desencadena la reorganització i agregació dels receptors d'acetilcolina en la zona de membrana on s'ha de produir el contacte neuromuscular (Bowe i Fallon 1995). D'aquesta manera, la combinació de factors i claus quimiotàctiques i l'acció de proteïnes reorganitzadores dels elements de la membrana postsinàptica garantitzen la formació de les noves connexions perifèriques.

La reinnervació, a més dels canvis que s'indueixen en la membrana de l'òrgan diana, implica també modificacions estructurals de les neurones regeneratives per tal de transformar els seus cons de creixement en botons presinàptics. Així, la progressió de l'axó regeneratiu mitjançant la polimerització de noves unitats de tubulina en la formació de microtúbuls està mediada per la fosforil·lació de la GAP-43 (Skene 1989), lligada a una cadena de reaccions bioquímiques que en darrera instància produeix la inactivació de diverses quinasas del con de creixement, inhibeix la seva unió a la calmodulina i causa una reducció dels processos de fosforil·lació i un descens dels nivells de la concentració d'ions  $\text{Ca}^{2+}$  lliures que dificulta la polimerització i l'estabilització de nous microtúbuls i per tant el procés d'elongació de l'axó regeneratiu (Strittmatter et al 1991). A la vegada aquesta metamorfosi dels segments regeneratius distals implica un increment del transport de vesícules que

fusionades amb la membrana dels cons de creixement augmenten la seva superfície i el seu volum citoplasmàtic. D'aquesta manera, les vesícules aporten lípids i proteïnes de membrana que col·laboren a estructurar la membrana presinàptica (canals de calci, bombes de sodi-potassi-ATPasa, receptors presinàptics, etc.) i, al mateix temps, s'estabilitza el citoesquelet de l'axó regenerat i augmenta el transport d'òrgànuls citoplasmàtics i de vesícules de neurotransmissors i neuromoduladors (Kelly i Grote 1993).

La darrera fase de la regeneració nerviosa és la maduració dels axons i les CS. En aquest període posterior a la reinnervació es produeix un increment del diàmetre axonal i del gruix de la beina de mielina. A més, l'axó incrementa la síntesi i el transport de proteïnes del citoesquelet. La CS, pel seu costat, mostra un increment de la síntesi de lípids i proteïnes de la mielina i una reducció de la producció de factors neurotròfics. Tots aquests canvis en conjunt comporten la maduració axonal des del punt de vista estructural i funcionalment la recuperació de la velocitat de propagació d'impulsos bioelèctrics per part de les fibres regenerades (Sunderland 1991). Tot aquest conjunt de canvis estructurals, bioquímics i fisiològics responen a la posada en funcionament d'un programa complex d'expressió i repressió gènica selectiva en neurones i CS. Així, quan es reestableix el contacte neuromuscular, s'observa un increment de l'expressió de gens que codifiquen la síntesi de lípids i proteïnes de la mielina (Johnson et al 1988) així com també d'alguns factors neurotròfics específics com el CNTF que s'acumulen al citoplasma de les CS (Sendtner et al 1992). Al mateix temps disminueix l'expressió dels gens que determinen l'expressió del receptor de baixa afinitat per a NGF (p75NGFR) i la neurotrofina NGF (Johnson et al 1988). El contacte intercel·lular incrementa també els nivells citoplasmàtics de AMPc en la CS i indueix a la seva vegada l'expressió gènica (LeBlanc i Poduslo 1990, LeBlanc et al 1992). Un dels factors de transcripció activats pels nivells d'AMPc és el SCIP ("suppressed cAMP-inducible POU") que es considera responsable dels canvis gènics a les CS que condueixen a la mielinització axonal (Scherer et al 1994). Al mateix temps, l'increment de AMPc intracel·lular també pot induir-se per factors difusibles secretats per les mateixes neurones regeneratives que d'aquesta manera exerceixen un control axonal indirecte sobre l'expressió gènica de les CS (Bolin i Shooter 1993).

De fet, les CS no només juguen un paper decisiu en la maduració neural, sinó també en la reinnervació perifèrica. Així, en la unió neuromuscular es pot observar que les CS no mielinitzants responsables del recobriment de la unió neuromuscular, participen en el manteniment i la reparació postlesiva de les sinapsis entre motoneurons i fibres musculars. Aquests cèl·lules són sensibles a canvis de la transmissió sinàptica que té lloc a la placa motora (Jahromi et al 1992) i responen a l'estimulació dels axons motors amb un canvi de la permeabilitat per ions calci mediat per canals dependents de voltatge o lligand (Robitaille 1995). D'altra banda, en processos de denervació muscular, aquestes cèl·lules també contribueixen al manteniment dels miòcits denervats al migrar cap a ells i alliberar acetilcolina (Brookes 1984). Al mateix temps, emeten processos citoplasmàtics múltiples fins les fibres musculars, que els serveixen de guia per al creixement dels axons motors durant la reinnervació i inhibeixen l'excés d'elongació axonal a les proximitats de la placa

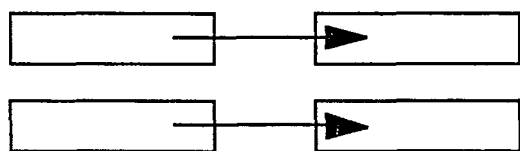
neuromuscular per iniciar la sinaptogènesi (Chiu et al 1991, Son et al 1996). Les CS terminals també promouen la col·lateralització terminal dels axons motors cap a diverses fibres musculars veïnes (Duvovy i Svizenska 1994).

Diversos estudis han demostrat que diferents tipus de fibres nervioses manifesten una capacitat diferencial per emetre colaterals, regenerar i reinervar les seves dianes (Navarro et al 1994, 1997). Pel que fa a la innervació muscular i sensorial dels fusos musculars, després de compressions perifèriques, s'observa un cert retard en la reinervació de fibres musculars intrafusals respecte de les extrafusals i la regeneració de fibres sensorials de projecció cutània i mostren patrons de reinervació permanentment deficitaris (Verdú i Navarro 1997). Així es troben crònicament alguns fusos musculars denervats o parcialment innervats amb una estructura anòmala. Els axons regeneratius sensorials es projecten sobre un territori distal d'extensió superior a l'original segons la seva capacitat de col·lateralització. Així, les fibres sensorials primes nociceptives (polimodals) presenten després de lesions una reinervació funcional més extensa que els axons sensorials gruixuts (mecanoreceptors de baix lllindar) (Povlsen et al 1994). Hi ha evidències que mostren que la reinervació funcional per axons prims sudomotors i nociceptius s'inicia abans i assoleix nivells superiors que la d'axons mielínics sensorials o motors (Navarro et al 1994). L'existència de diferències en la taxa de regeneració i el temps de maduració i l'establiment de sinapsis de *novo* entre aquests tipus de fibres nervioses podrien explicar aquest fet (Navarro i Verdú 1997). L'estudi immunohistoquímic de la innervació intraepidèrmica per part de terminacions lliures amb funció termoceptora o nociceptora demostra que, després de secció nerviosa, el patró de reinervació dèrmic i epidèrmic és deficient respecte de l'original o respecte del mostrat després d'una compressió. Així s'observa un nombre elevat de terminacions lliures que queden aturades a nivell de la membrana basal epidèrmica mostrant una dificultat per travessar-la (Stankovic et al 1996, Verdú i Navarro 1997). De fet, en lesions de secció, difícilment els axons aconseguen resituar-se al seu tub endoneurial original produint en la majoria dels casos un redireccionament erroni del axó regenerativa. Les fibres intraepidèrmiques corresponen a axons amielínics tipus C o terminals derivades de fibres mielíniques localitzades a la dermis que perden el seu embolcallament en travessar la membrana basal epidèrmica, quedant l'axó en contacte directe amb els queratinòcits. Quan les fibres amielíniques degeneren, no es formen bandes de Büngner, raó per la qual els axons amielínics tenen més dificultat per trobar punts per travessar la membrana basal del límit dermo-epidèrmic (Stankovic et al 1996). Quan es compara la reinervació funcional amb l'estudiada per mètodes immunohistoquímics es pot observar que la recuperació de la funció muscular i sudomotora té lloc aproximadament 48 hores després de l'aparició de perfils nerviosos sobre aquestes dianes (Verdú i Navarro 1997). Aquest retard és probablement el temps necessari per tal que els axons motors i autonòmics efectuin la neosinaptogènesi que sembla bastant semblant entre axons motors i autonòmics. Per contra i paradoxalment, el mateix estudi demostra la recuperació funcional de la sensibilitat dolorosa 48 hores abans de la presència de perfils immunoreactius a PGP 9.5 intraepidèrmics. Les terminals lliures regeneratives poden començar a respondre a estímuls nociceptius en la profunditat malgrat no haver aconseguit travessar la làmina basal epidèrmica (Verdú i Navarro 1997).

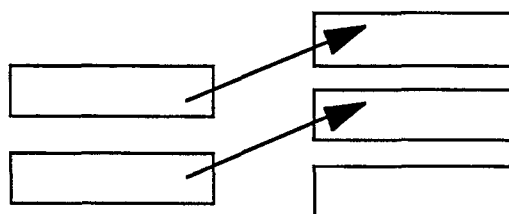
#### 4. Especificitat de la reinnervació perifèrica

La correcta restitució funcional després d'una lesió nerviosa no només exigeix l'èxit de la regeneració axonal i de la reinnervació de dianes perifèriques, sino que precisa també d'una apropiada reconexió entre neurones i òrgans diana, amb un patró similar al normal o com a mínim compatible amb el desenvolupament de la funció. Els principis que regulen la conducta de navegació axonal després de lesions i la capacitat que tenen els axons lesionats per reinnervar les seves dianes originals estan condicionats simultàniament per quatre tipus de mecanismes: neurotropisme, guiatge per contacte, neurotrofisme i alineament quirúrgic (Fig. I.4.1).

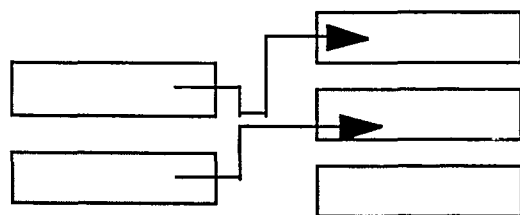
##### A. Alineament quirúrgic



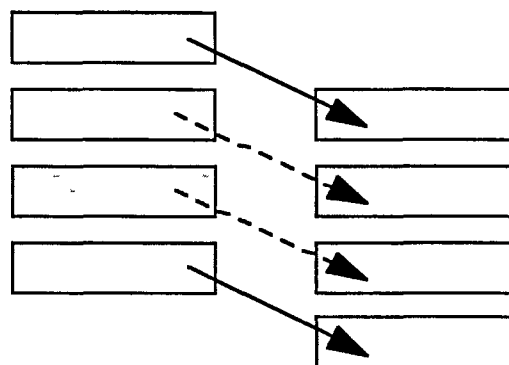
##### B. Guia per contacte



##### C. Neurotropisme



##### D. Neurotrofisme



**Fig. I.4.1.** Teoris que determinen els mecanismes d'especificitat. A. Alineament quirúrgic: el destí axonal queda determinat al punt de reparació per l'alineament de la sutura. B. Guia per contacte: els axons regeneratius són guiats al seu extrem distal correcte gràcies al reconeixement d'un substrat de senyals moleculars. C. Neurotropisme: els axons regeneratius són atrets cap a l'extrem distal corresponent després d'escollir la trajectòria adequada responant a factors difusibles alliberats per l'extrem distal. D. Neurotrofisme: els axons seleccionen a l'atzar els tubs endoneurials distals; aquells que aconseguixen fer contacte amb una diana adequada reben suport tròfic, maduren es mielinitzen, mentre que la resta seran eliminats (Doolabh et al 1996).

El *neurotropisme* fa referència a l'atracció quimiotàctica a través d'una distància interneural pels efectes promotors del creixement i guia d'una sèrie de factors quimiotàctics alliberats a distància per l'extrem neural o les dianes distals. El *guiatge per contacte* posa èmfasi en la regulació del creixement dels axons mitjançant factors moleculars localitzats a l'entorn dels axons i en el reconeixement del camí correcte mitjançant la interacció amb substrats que regulen l'adhesió de l'axó a la membrana basal. El *neurotrofisme* suggereix que la selecció de tub endoneurial per part de l'axó s'efectua en funció del nivell de substàncies tròfiques que assegurin la supervivència neuronal i l'elongació i la mielinització axonals fins la diana en el menor temps possible i per fenòmens de identificació

específica. Al mateix temps, la hipòtesi neurotròfica destaca l'important efecte de l'òrgan diana com a font de factors de creixement adequats, de manera que els axons que en un cert temps no aconseguïen reinnervar dianes adequades no aconseguiran sobreviure o si més no madurar. Finalment, la teoria de *l'alineament quirúrgic* assumeix que el destí final dels axons regeneratius ve principalment determinat per la disposició o enfocament de l'axó respecte dels tubs endoneurials amb els que quirúrgicament ha estat posat en contacte, de manera que una vegada encarat a un determinat tub endoneurial, per raons mecàniques, no pot corregir la seva trajectòria. En aquest context l'alineament entre els extrems neurals proximal i distal és el principal factor determinant de l'especificitat de la reinnervació de troncs plurifasciculars (Doolabh et al 1996).

#### **4.1. Poliinnervació, hiperinnervació, innervació aberrant**

Els axons regenerats reconnecten amb estructures diana, recuperant la seva capacitat per transmetre en direcció aferent o eferent senyals bioelèctrics. La reinnervació i l'establiment de connexions sinàptiques actives per part d'axons regeneratius no garanteix però la recuperació de la funció global (Sumner 1989). L'axó col·lateralitza de manera prolífica en el punt de lesió i emet múltiples branques cap a tubs endoneurials distals. L'especificitat topogràfica i funcional de la reinnervació de cada axó i el nombre de branques de cada neurona és determinant per a la qualitat de la recuperació final obtinguda. Aquesta depèn, entre d'altres factors, de la gravetat de la lesió (Brushart 1988), el procediment reparatiu emprat (Brushart 1993), el nombre de bifurcacions del tronc nerviós (Sumner 1989, Brushart et al 1998), el grau de regeneració assolit i del temps de recuperació de la lesió (Madison et al 1996). Així, s'han descrit diferents trastorns de la qualitat de la reinnervació -poliinnervació, reinnervació inespecífica i hiperinnervació- que entorpeixen l'ús de sinapsis actives per al correcte desenvolupament d'una funció complexa com la deambulació, la manipulació d'objectes o la discriminació i localització tàctil. La poliinnervació té lloc quan una mateixa diana és reinnervada al mateix temps per diferents axons o per terminals d'un axó pertanyent a una mateixa neurona, cadascuna de les quals estableixen la seva sinapsi. Aquest procés es produeix poc després de l'arribada de l'axó sobre la diana i pot arribar a afectar fins al 60% de les fibres musculars i presenta una tendència a reduir-se amb el temps (Gorio et al 1983). La reinnervació inespecífica és el contacte d'una diana per part d'un axó únic d'una neurona que originalment no l'innervava (Sumner 1990). Els efectes funcionals són especialment notables quan les motoneurons que innervaven musculatura flexora reinnerven després de la lesió musculatura extensora de la mateixa extremitat, o quan algunes neurones sensorials canvien el seu territori de projecció cutàni (Sumner 1990, Montserrat i Benito 1988). La reinnervació inespecífica d'axons motors sobre territoris sensorials té també tendència a reduir-se amb el temps i l'ús (Brushart et al 1993). El concepte d'hiperinnervació fa referència a la innervació d'una mateixa òrgan distal per múltiples axons procedents de diferents neurones, que al mateix temps emeten altres branques sobre múltiples dianes. Depèn de la quantitat de branques col·laterals emeses en el punt de lesió per cada axó seccionat i no té tendència a reduir-se espontàniament amb el temps (Angelov et al 1993, Angelov et al 1996). El resultat és l'activació simultània, per la despolarització d'una única neurona, d'òrgans diana, generalment musculars, el funcionament dels quals no està habitualment sincronitzat (Angelov et al 1995). Els fenòmens de

poliinnervació, hiperinnervació i reinnervació aberrant són els principals causants de l'anomenada síndrome de paràlisi postquirúrgica, que té lloc després de lesions de nervis perifèriques, consistent en el bloqueig del moviment, moviments associats anormals, discinèsies i pèrdua de control i coordinació motora (Kimura et al 1975, Bento i Miniti 1993). Les neurones que projecten sobre dianes perifèriques equivocades no presenten sempre capacitat per adaptar el seu comportament electrofisiològic (patrons de descàrrega) a les necessitats dels òrgans erròniament reinnervats (Gruart et al 1996), encara que alguns dels pacients afectats per aquesta mena de fenòmens post-reinnervatius poden aprendre a recodificar els moviments i la topografia sensorial.

#### 4.2. Activitat neurotròpica i nivells d'especificitat

El terme *neurotropisme* s'utilitza en neurobiologia per descriure la regeneració d'un axó dirigida per un gradient de concentracions de factors fins a reinnervar una diana específica, en front d'altres tipus cel·lulars i òrgans no afins (Brushart 1991). Un dels debats científics a l'entorn de la regeneració se centra en l'existència o no d'especificitat mediada per fenòmens tròpics a entre els axons regeneratius i teixit nerviós, amb el seu tronc o fascicle nerviós corresponent, respecte el seu tub endoneurial original, amb una diana que li sigui tissularment corresponent i fins i tot un òrgan no només tissularment sinó funcionalment adequat.

En el context de la teoria neurotròpica, cal distingir jeràrquicament dels nivells d'especificitat més grollers fins als més fins entre especificitat de teixit o tissular, especificitat fascicular o de tronc nerviós, especificitat de funció motora *versus* sensorial, especificitat topogràfica i especificitat d'òrgan diana. El terme especificitat de *teixit* expressa la capacitat del col·lectiu d'axons regeneratius de dirigir-se cap a un segment distal nerviós i no cap a estructures connectives, òssies o d'altres teixits no neurals. L'especificitat *fascicular* o *troncular* descriu la capacitat dels axons d'un fascicle determinat de trobar el seu corresponent extrem distal com seria la regeneració dels axons del nervi peroneal a través de l'extrem distal del fascicle peroneal després d'una lesió del nervi ciàtic. L'especificitat *sensori-motora* és la que separa els axons aferents dels eferents i juga un paper determinant la població d'axons que reinnerva nervis tributaris. En aquest context, l'especificitat *topogràfica* demostra la capacitat dels axons que es projectaven sobre una regió corporal de reinnervar la mateixa zona després de la lesió. Així, per exemple, després d'una lesió del nervi mitjà, els axons sensorials que recollien la sensibilitat del dit índex s'han de projectar cap aquest mateix dit per garantir una correcta localització dels estímuls. Finalment, l'especificitat d'*òrgan diana* es produeix quan una neurona reinnerva preferentment el tipus de diana que originalment innervava i per al qual ocupa una disposició anatòmica i presenta connexions específiques amb vies i nuclis centrals (Brushart 1998). Les dades dels estudis realitzats fins al moment confirmen l'especial afinitat dels axons regeneratius pel seu extrem distal davant d'altres teixits, posen en dubte l'existència d'un neurotropisme fascicular, i confirmen en un model de nervis mixtes l'afinitat especial dels axons motors per dianes musculars (Brushart et al 1988, 1990, 1993) i dels sensorials per regions cutànies (Madison et al 1996). En termes globals tot i que una gran majoria dels factors tròpics, molècules d'adhesió, proteïnes de la matriu extracel·lular i molècules d'activitat neurotròpica

durant el desenvolupament han estat implicades, es desconeixen els elements moleculars que fan possible aquesta identificació en models de lesió i regeneració en animals postnatsals i adults.

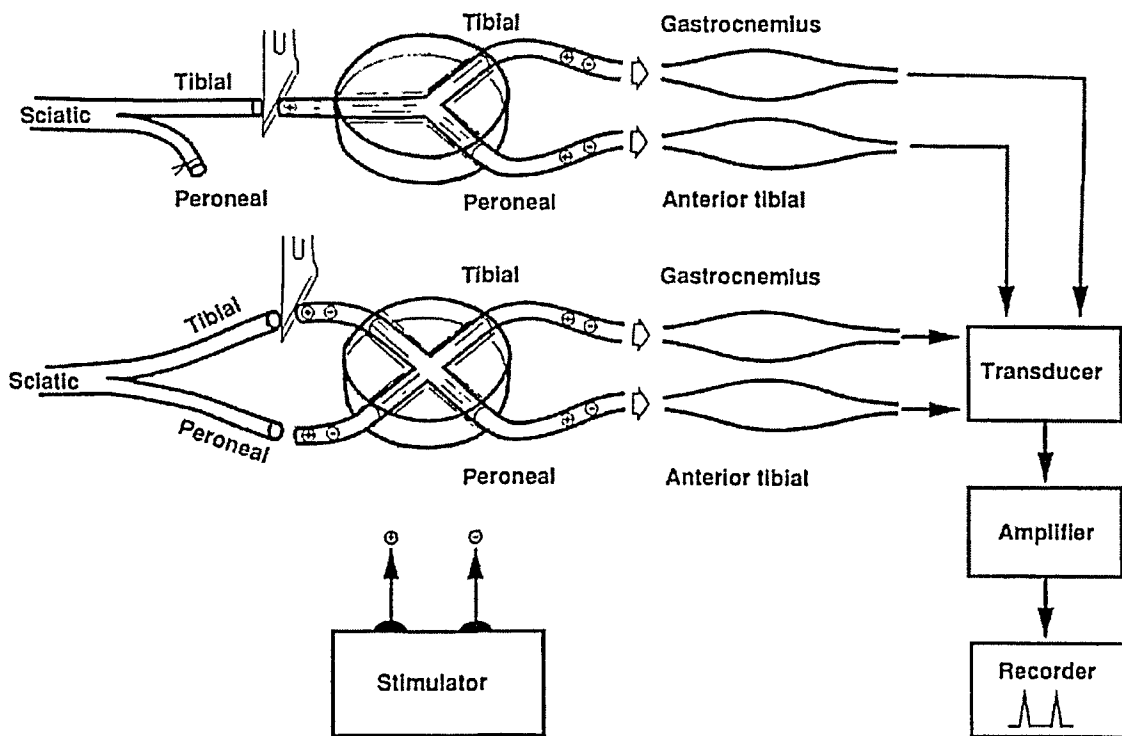
#### 4.2.1 *Neurotropisme tissular*

Les teories neurotròpiques i quimiotròpiques dels axons regeneratius i l'efecte de l'extrem distal nerviós va ser enunciades per primera vegada per Forssman (1898) i revisades posteriorment per Ramon y Cajal (1928). Aquest autor va establir que la navegació axonal estava condicionada per l'acció de diferents elements -entre ells les CS-, però que aquesta influència no era individual i específica entre cada axó i cada tub endoneurial sinó general i col·lectiva per a tots ells, que són dirigits cap a la perifèria; va batejar aquest fenomen amb el nom de *neurotropisme*. Cal als anys quaranta, Weiss i col·laboradors van descartar després d'una sèrie de treballs, posteriorment molt criticats, la hipòtesi neurotròpica de Cajal (Weiss i Taylor 1944, Weiss i Hoag 1946). Aquest fet va descoratjar la receca en aquest camp durant un parell de dècades. A principis dels 80, Lundborg va demostrar que els axons regeneraven dins d'una cambra tubular en sentit obliqu per tal de dirigir-se adequadament cap a l'extrem distal que havia esta suturat a l'angle oposat (Lundborg 1982). Posteriorment diferents treballs van posar de manifest que, davant la disjuntiva de regenerar cap a dos teixits diferents exposats a l'extrem nerviós proximal per mitjà d'un tub en "Y", els axons es dirigien preferentment cap a teixit nerviós (extrem nerviós distal) que cap a teixit ossi, tendinós o de granulació (Lundborg et al 1988, Mackinnon et al 1986). Aquests experiments, consistents amb l'hipòtesi neurotròpica de Cajal, no van aconseguir demostrar-la de manera específica, donat que les diferències observades podrien ser atribuïdes a la distribució i la disponibilitat de factors neurotròfics de subpoblacions d'axons que determinen a la vegada la seva capacitat de sobreviure. Recentment, s'ha demostrat l'efecte atractiu de l'extrem distal sobre les CS productores de factors neurotròfics (Abernethy et al 1994). La manca d'extrem nerviós distal produeix una elongació erràtica dels axons regeneratius, els quals quan s'enfronten a l'extrem distal mostren una clara direccionalitat fins i tot abans d'arribar a contactar amb ell (Kuffler 1989).

#### 4.2.2 *Neurotropisme fascicular*

Per demostrar que existia neurotropisme de tronc nerviós o fascicular, Politis i col·laboradors van exposar els axons seccionats dels nervis tibial o peroneal de rata en un extrem del tub en "Y" als extrems distals fasciculars d'aquests dos nervis, separats per un espai interneurals de 5 mm. Al cap de 4 setmanes, es va observar una selectivitat de creixement dels axons peroneals cap a l'injert peroneal (Politis et al 1982, Politis 1985, Politis i Stess 1986) (Fig I.4.2). El breu període de seguiment, però, no va permetre discriminar entre el possible efecte neurotròfic que promouria el creixement selectiu dels axons amb més disponibilitat de factors de creixement i un veritable efecte neurotròpic. Els intents de replicar aquests experiments en models de tubs en "Y" utilitzant fascicles nerviosos distals i comptant el nombre d'axons han conduït cap a resultats controvertits . Així, Seckel i col·laboradors van trobar una selectivitat de 2:1 entre axons que projecten sobre l'extrem corresponent respecte de l'equivocat entre tibial i peroneal a través d'un espai de 8 mm a les 6 setmanes (Seckel et al 1986), mentre que d'altres observen un increment de la selectivitat per damunt

d'aquesta ratio en un gap de 10 mm i amb un temps de seguiment més llarg (Davey et al 1992). Per contra, altres autors no troben cap mena de selectivitat peroneal-tibial a través d'un gap més curt de 6 mm després de 6 setmanes (Abernethy et al 1992). Tornant al model original de Politis un estudi va comparar el grau d'especificitat de la reinnervació que s'aconseguia utilitzant extrems nerviosos distals lligats a la seva diana corresponent o bé injerts de extrems nerviosos distals. Es va observar que la proporció entre axons correctament dirigits i equivocats era pitjor en el primer dels casos i que aquestes diferències es posaven especialment de manifest a partir dels 30 dies postlesió, moment en què les terminals contactaven amb el múscul (Zhao et al 1992a). Les propietats neurotròpiques podrien tenir més a veure doncs amb la interacció amb l'òrgan diana que amb el segment nerviós distal. Altres treballs han demostrat que la tubulització és una bona alternativa a la sutura directa i incorrectament orientada dels fascicles nerviosos, ja que aconseguia una millor especificitat de reinnervació i una recuperació funcional més adequada, en donar un marge als axons per deixar actuar les possibles propietats neurotròpiques i no forçar mecànicament l'error (Evans et al 1991). Amb tècniques de traçadors fluorescents s'ha demostrat que en distàncies interneurals d'entre 2 i 5 mm no hi ha evidències d'especificitat fascicular, de manera que els axons se situen en el tub endoneurial que tenen davant (Brushart 1995). Totes les dades semblen indicar que el neurotropisme tissular que manifesten els axons regeneratius pel teixit neural, no es dona a nivell dels troncs fasciculars (Doolabh et al 1996).



**Fig I.4.2.** Esquema de la mesura de la força tetànica dels músculs gastrocnèmi i el tibial anterior reinnervats a través de tubs per axons dels fascicles tibial o del peroneal (tubs en "Y") o simultàniament per axons d'ambdós fascicles (tubs en "X"). Aquest sistema permet quantificar l'especificitat funcional i/o histològica de cadascun d'ells pel seu extrem distal i el percentatge de reinnervació funcional aberrant (Zhao et al 1992a, 1992c).



#### 4.2.3 El paper del segment nerviós distal

Una majoria d'autors han mostrat que la presència de l'extrem distal afavoreix la regeneració (Mackinnon et al 1985, 1986, Lundborg et al 1986, Jenq i Coggeshall 1986), encara que alguns estudis han demostrat que la presència de l'extrem distal no és imprescindible per tal que s'iniciï la regeneració (Scaravilli 1984, Ochi 1983). Quan s'ha comparat en tubs en "Y" el grau de regeneració axonal de la branca femoral sensorial exposada a l'extrem distal connectat al seu territori cutani *versus* un empelt aïllat de nervi distal, s'ha pogut veure una reinnervació preferent i una maduració més elevada dels axons que escollien el primer dels camins (Mackinnon i Dellon 1992), fet que demostraria o bé el possible efecte del transport retrògrad de factors des dels òrgans diana en la selecció axonal o bé simplement la selecció de la branca més dotada de factors de creixement per part de l'axó regeneratiu. També hi ha controvèrsia en relació a l'existència d'una especificitat determinada per l'òrgan diana d'un mateix tipus de teixit. Així mentre alguns autors han trobat una reinnervació selectiva després de lesions de mecanoreceptors cutanis tipus I per axons adequats (Horch 1982) o de dianes musculars específiques (Mackinnon et al 1985a, 1988, Laskowski i Sanes 1988) especialment després de lesions compressives, d'altres descriuen després de transeccions una gran quantitat d'anomalies en la reinnervació i la selecció de les dianes musculars i sensorials correctes (Rende et al 1991, Brushart 1990). L'especificitat en la selecció d'òrgans diana correspondria a un fenomen probabilístic basat en l'existència de gradients de molècules guia. Així, existiria una relativa identificació específica d'axons motors per fascicles distals motors, que s'incrementa en cas que l'extrem distal condueixi a l'òrgan diana adequat (Brushart 1993, 1998).

#### 4.2.4. Innervació motora preferent

La selectivitat de la regeneració d'un nervi mixt cap a les seves dianes musculars i cutànies ha permès analitzar els mecanismes de la selecció de tubs endoneurials en cas d'encert i d'error. Així, s'han descrit axons motors que penetren en tubs endoneurials sensorials envoltats de CS, així com axons sensorials regenerant a través de fascicles motors (Zalewski 1970) que en ambdós casos no aconseguen establir sinapsis funcionals i eren eliminats posteriorment. Brushart i col·laboradors (1987, 1988, 1990, 1993) ha demostrat en diversos treballs l'existència d'una selecció específica d'axons motors (del nervi femoral) exposats a fascicles i dianes sensorials i musculars pels fascicles motors, i d'una reinnervació acurada d'aquests de dianes musculars. Aquest fenomen ha estat batejat amb el nom de reinnervació motora preferent. Aquest suposat fenomen de *neurotropisme* es produeix fins i tot en lesions malalineades o a través d'una certa distància interneural (Brushart 1988). Experiments amb retrotraçadors destinats a analitzar l'evolució temporal de la reinnervació motora preferent ha demostrat que el nombre de motoneurons que envien branques a terminals sensorials és inicialment molt elevat, però disminueix amb el temps, a la vegada que s'incrementa l'especificitat de la reinnervació. Aquest fet provaria l'existència d'una reinnervació inicial produïda a l'atzar per col·lateralització abundant dels axons regeneratius (*sprouting*), que envien simultàniament col·laterals a diferents fascicles distals, i posteriorment d'una esporgada posterior de les terminals que es projecten sobre territoris distals incorrectes (*pruning*) que permet assolir l'especificitat.

## 5. Reorganització funcional després de lesions del sistema nerviós perifèric

Les lesions dels nervis perifèrics produeixen la desconexió dels òrgans efectors (musculars i autonòmics) i receptors (sensorials) perifèrics dels centres de processament, control i generació d'ordres neurals, que es reverteix parcialment amb la regeneració i la reinnervació distals. La reconexió axó-òrgan diana no sempre garanteix la recuperació de circuits complexos de control i processament motor, sensorial i autonòmic, que impliquen a més d'estructures perifèriques altres elements neuronals i gials centrals amb els quals s'estableixen interrelacions sinàptiques i/o metabòliques. Al mateix temps, la reinnervació no sempre assegura el retorn de la cèl·lula a un model de funcionament idèntic a l'original. El patró morfològic i funcional de les sinapsis que les neurones mantenen a nivell espinal canvia per l'aïllament ocasionat per l'axotomia i no sempre retorna amb la reinnervació a la situació prèvia a la lesió. A més, immediatament després d'una lesió axonal, el soma neuronal pateix la retracció del seu arbre dendrític i la desconexió de les sinapsis que tenia amb neurones propiespinals o de projecció. La desconexió dels òrgans perifèrics i l'activació del programa de "creixement" axonal redueix l'aportació de proteïnes estructurals pel manteniment de les dendrites per concentrar els esforços en la regeneració axonal (Pastor et al 1997, Fu i Gordon 1997). Canvis de les propietats cel·lulars de les neurones motores i sensorials, de les sinapsis espinals i dels mapes que determinen la somatotòpia tenen lloc després de lesions i tot i que tenen tendència a involucionar amb la lesió, no sempre retornen a les seves característiques prelesionals. Una part molt important de les alteracions en l'elaboració i el control de moviments complexos o la determinació d'estímuls perifèrics que té lloc després de lesions de nervis perifèrics es poden explicar per aquest conjunt d'esdeveniments (Carrier et al 1997)

### 5.1. Canvis cel·lulars i sinàptics

La reorganització funcional que experimenta el sistema nerviós després de lesions és fonamentalment deguda a modificacions a nivell sinàptic. L'eficàcia sinàptica no és constant al llarg del temps i pot modificar-se fisiològicament per l'acció d'impulsos procedents d'altres vies, que actuen a nivell pre o postsinàptic. Els mecanismes de modulació produeixen els seus efectes de manera habitual en els circuits espinals en activitats molt diverses com la deambulació, el processament sensorial o la respiració. La modificació de la transmissió sinàptica a la medul·la espinal es pot produir després de diferents tipus i models d'estimulació en condicions fisiològiques (sensibilització, habituació, depressió, facilitació, potenciació postetànica i condicionament clàssic) o patològiques (axotomia motora o sensorial i lesions espinals). Les lesions perifèriques o espinals poden produir modificacions permanents i, per tant, no reversibles de la transmissió entre neurones (Mendell 1984). Els elements neuronals que componen aquestes sinapsis pateixen després de la lesió una modificació de les seves propietats estructurals i funcionals d'excitabilitat cel·lular (Eccles et al 1958, Horch i Lisney 1981). L'increment del potencial de repòs transmembrana (Carmignoto et al 1988), canvis en l'estructura i el nombre dels seus canals iònics de sodi (Zhang, et al 1997) i potassi (Ishikawa et al 1999) dendrítics, somàtics i axonals induïts per la lesió i l'estimulació aferent continuada pel contacte mecànic dels axons seccionats en el punt de lesió (Devor et al 1989)

transformen la cèl·lula en hiperexcitable i expliquen la facilitació de les respostes mediades per vies reflexes espinals dels músculs reinnervats (Eccles et al 1958, Angelov et al 1998). Les neurones són molt sensibles a canvis lesius, regeneratius o reinnervatius de la seva innervació perifèrica, modificant de manera no sempre adaptativa el seu patró de descàrregues a les característiques de la cada situació (de la Cruz et al 1996). Aquest conjunt de canvis plàstics apareixen molt poc temps després de la lesió (Donoghue et al 1990, Valls-Solé et al 1992) i en funció de la severitat de la lesió (Wall et al 1983), l'extensió total del territori denervat (Huerta i Wall 1987), del nivell de recuperació final i, molt especialment, del grau d'especificitat assolit per la reinnervació (Wall i Kaas 1986), poden readquirir la seva localització, extensió i nivell d'excitabilitat originals. Quan per alguna de les raons esmentades, aquests canvis plàstics estructurals i funcionals no involucionen impossibiliten la recuperació del patró global de desenvolupament d'activitats i generen, entre d'altres, problemes importants en la coordinació de moviments, la integració sensorio-motora i el desenvolupament de funcions complexes (Wasserschaff 1990).

### 5.1.1 Canvis de les propietats de les motoneurones axotomitzades

L'axotomia indueix canvis en les propietats electrofisiològiques i sinàptiques de les motoneurones que es manifesten com una disminució de la reobase, un decreixement del llindar d'excitabilitat i un increment de la resistència d'entrada, produïts tots ells per l'increment de volum de la cèl·lula, i la disminució del potencial de repòs transmembrana. La neurona mostra, un estat d'excitabilitat i dendrítica incrementada que indica canvis de les propietats del segment inicial de l'axó (Eccles et al 1958). S'ha descrit també un escurçament de la durada de la fase d'hiperpolarització del potencial i un increment del nombre de potencials d'acció disparats per unitat de temps davant d'un únic estímul (Gustafsson 1979). Des del punt de vista de les connexions sinàptiques que estableix, hi ha una disminució de les entrades de certs reflexos segmentaris, una disminució de l'amplitud dels potencials excitatoris postsinàptics (PEPS) i un allargament de la latència i la durada de resposta sinàptica. Aquest darrer fenomen ha estat atribuït a la pèrdua progressiva d'interaccions entre terminals de la neurona sensorial (Ia) i la motoneurona (Kuno i Llinàs 1970) postaxotomia, fenomen que es correspon amb observacions histològiques que descriuen una eliminació progressiva de proximal a distal de botons sinàptics i concomitantment la proliferació de cèl·lules glials. Donat que els canvis en l'amplitud i la durada dels PEPS s'observen 4 setmanes abans que es verifiqui histològicament la disminució de la connectivitat, sembla que l'axotomia podria induir inicialment modificacions funcionals de les connexions axodendrítiques, com per exemple la desensibilització dels receptors postsinàptics.

La lesió axonal no només afecta les sinapsis excitatòries sinó algunes de les projeccions inhibidores que a través de les mateixes fibres Ia o en menor mesura per les aferències més distals de les cèl·lules de Renshaw, tenen lloc sobre la motoneurona (Kuno i Llinàs 1970). Poc temps abans de la desconnexió o "*stripping*" glial, s'observa un decreixement de la velocitat de conducció a través de la part intacta de l'axó de la neurona axotomitzada que afecta per igual motoneurones ràpides i lentes. Finalment cal destacar que les motoneurones ràpides axotomitzades mostren un allargament de la

fase de posthiperpolarització (Kuno et al 1974), mentre que les lentes presenten un escurçament. Aquests canvis afecten la freqüència de descàrregues i alteren conseqüentment el reclutament d'unitats motores en la realització de moviments. La reinnervació muscular produeix la normalització de les propietats reflexes així com la velocitat de conducció, l'amplitud i la durada del PEPS (Mendell i Scott 1975). Tenint en compte la persistència d'alteracions en el reclutament d'unitats motores, sembla que es mantenen algunes alteracions en l'eficàcia de les entrades sinàptiques i de les propietats de les motoneurons (Milner-Brown et al 1974) fins i tot després de la reinnervació distal.

### 5.1.1 Canvis de les propietats de les neurones sensorials axotomitzades

La lesió produeix una disminució de la velocitat de conducció del segment intacte més pronunciada que la de les neurones motores. S'observa també un decreixement progressiu de l'activitat sinàptica espinal induïda per estimulació perifèrica distal al nivell de lesió, amb una disminució de l'amplitud dels PEPS de les fibres sensorials gruixudes Ia sobre motoneurons espinals del reflex monosinàptic (Mendell i Scott 1975). Curiosament, l'estimulació de fibres nervioses Ia en regeneració i que encara no han arribat a establir sinapsis amb els fusos musculars mostren PEPS d'amplitud superior als normals en les motoneurons amb les quals estableix sinapsi (Gallego et al 1979, Mendell et al 1999). Aquesta facilitació sinàptica està produïda per un increment de l'eficàcia dels inputs de les neurones sensorials i les fibres Ia sobre les motoneurons (Gallego et al 1980) en aquesta fase inicial de la regeneració. La regeneració i la reinnervació perifèrica determinen la renormalització del funcionament sinàptic, encara que les unitats motores lentes es mostren més sensibles a la lesió perifèrica i a la vegada més refractàries a la millora. L'estimulació de terminals sensorials d'interneurons que sinapten amb el procés central de neurones sensorials axotomitzades perifèricament produeix una reducció de la magnitud i la freqüència de potencials d'arrel dorsal. Aquesta reduïda activitat sinàptica central en vies de connexió de neurones sensorials es produeix després de lesions de transecció, mentre que la compressió no genera canvis apreciables (Devor i Wall 1981), i es postula que és deguda a la retracció o atròfia de les terminals espinals de les neurones sensorials o a la retirada per "*stripping*" glial de les terminals interneuronals que hi afereixen (Horch i Lisney 1981). La reorganització de la connectivitat espinal després de lesions perifèriques hauria de permetre restaurar un patró normal entre fibres aferents i motoneurons que restitueixi els arcs reflexos originals en cas d'innervació perifèrica aberrant motora o sensorial (Brushart et al 1981).

Les lesions nervioses perifèriques poden induir a més fenòmens de potenciació a llarg termini (LTP) a les sinapsis espinals (Sandkühler i Liu 1998). De fet, el processament de la informació nociceptiva a la medul·la espinal es pot modificar durant llargs períodes de temps (Woolf 1984). L'excitació per estímuls d'elevada intensitat de fibres nociceptives (A $\delta$  i C) que té lloc en lesions del sistema nerviós perifèric produeix un increment de les respostes conductuals a l'estimulació i un augment de la percepció de dolor, conegut com hiperalgèsia. Aquest fenomen de plasticitat estructural funcional es produeix d'una banda per la sensibilització dels nociceptors perifèrics així com també per canvis de

plasticitat neural que tenen lloc a la banya dorsal de la medul·la espinal. Tot i que els mecanismes que la produeixen no acaben d'estar clars, se sap que l'estimulació continuada de l'arrel dorsal pot incrementar o disminuir l'eficàcia sinàptica espinal, mentre que la potenciació a llarg terme es pot aconseguir per mitjà de corrents breus d'elevada freqüència aplicades sobre fibres C aferents (Sandkühler i Liu 1998). El patró d'estimulació i la sincronicitat de descàrregues en fibres nervioses convergents són factors crítics per a la inducció de canvis de l'eficàcia sinàptica de llarga durada. L'activació de receptors NMDA, substància P i neuroquinina A a través de l'estimulació de terminals A $\delta$  i C és indispensable per desencadenar aquests canvis, donat que el bloqueig de receptors N-metil-D-Aspartat anul·la parcialment l'efecte de LTP. Aquesta constatació recolza la hipòtesi del paper de la LTP espinal com a causant de canvis funcionals i o estructurals a nivell sinàptic permanents en la gènesi del dolor neuropàtic (Sandkühler i Liu 1998) i en les alteracions de l'activitat de reflexos monosinàptics i polisinàptics espinals.

## 5.2. Plasticitat central postlesió perifèrica

Les lesions perifèriques no suposen alteracions només dels territoris distals sinó que modifiquen de manera significativa i a vegades irreversible l'organització musculotòpica i somatotòpica a nivell cortical, subcortical i espinal. Els mapes somatotòpics de cervells madurs mostren fenòmens dereorganització com a resposta a canvis en els patrons d'estimulació o entrenament i també, davant de seccions nervioses perifèriques, amputacions o lesions espinals (Jain et al 1998). La desaferentització d'un territori sensorial i la desconexió central d'òrgans musculars desencadenen canvis importants de l'organització connectiva i l'excitabilitat no només d'estructures i circuits espinals (Mendell 1984, Wasserschaff 1990), sino també subcorticals (Garrathy et al 1990, Jain et al 1998), corticals motores (Donoghe et al 1990, Sanes et al 1990) i somatosensorials (Doetsch et al 1996). El desenmascarament de connexions preestablertes silents (*unmasking*) com a mecanisme a curt terme o la col·lateralització (*sprouting*) de neurones veïnes funcionants a llarg terme explica la remodelació immediata i diferida de circuits centrals pel control motor o la percepció sensorial de territoris adjacents.

### 5.2.1 Fenòmens de plasticitat postlesió

El mapa sensorial i motor de la mà està representat a les àrees 3b i 1 del còrtex somatosensorial presenta en primats no lesionats unes subàrees de projecció específica per a cadascun dels dits (Jenkins et al 1990a, 1990b). Després d'una secció no reparada del nervi mitjà en primats, regions de l'antic territori cortical desconnectat per la lesió passen a formar part a les representacions de nervis adjacents intactes com el radial. Després de la lesió del nervi mitjà es desencadena una zona cortical silent o "*black hole*" corresponent a l'àrea que controla el moviment i la sensibilitat dels seus territoris de projecció muscular i cutani. Aquestes regions mostren activació per estímuls aplicats sobre territoris cutanis perifèrics del dors de la mà (Merzenich et al 1983). Amb el temps, també els territoris del nervi cubital s'expandeixen també sobre les regions corticals desaferentitzades. Les propietats reorganitzatives corticals no són però ilimitades i independents del volum de lesió infringida. Les seccions combinades i no reparades dels nervis radial i mitjà o cubital generen un llarg

període silenci funcional sobre la regió cortical que a vegades resulten permanents (Wall i Kaas 1986, Wall et al 1986, Jain et al 1998). La reorganització cortical a més té lloc a les poques hores de la denervació perifèrica i comporta simultàniament un descens del llindar d'evocació de respostes motores per estimulació de motoneurons adjacents a les desconnectades (Donoghue et al 1990). Quan la secció nerviosa ve seguida d'una reparació per sutura que afavoreix la regeneració nerviosa, es recupera l'activació d'una gran part del territori cortical original, encara que l'organització somatotòpica es manté alterada (Florence et al 1994). Una gran part de les neurones mantenen camps receptius múltiples mentre que neurones de la mateixa regió cortical responen a estímuls de àrees cutànies no adjacents i a la inversa, les representacions corticals de regions perifèriques adjacents mostren una estructura mosaïcial en la superfície cortical repartides en petits "illots" cel·lulars. En canvi, en lesions de compressió nerviosa en les quals els axons creixen pels seus fascicles originals sí per contrast, s'observa una recuperació del mapa cortical original.

La inespecificitat de la reinnervació perifèrica després de lesions de secció o resecció impedeix que la somatotòpia normal pugui reestablir-se en un procés que és dependent de la qualitat de la reinnervació perifèrica (Wall et al 1983). Les capacitats del còrtex reorganitzat de manera forçada per canvis en el patró d'innervació perifèrica són incertes. En humans, les alteracions de la localització sensorial es mantenen permanentment fet que indica que els errors de la reinnervació no es corregeixen al cervell. De manera anàloga, quan un empet de pells és transferida amb la seva innervació associada d'un dit a l'altre, les alteracions en la localització dels estímuls que aplicats sobre el dit destinatari són referides al de la procedència de l'empelt es mantenen durant molt de temps (Mogilner et al 1993). De fet, les representacions somatosensorials del dit d'origen i de destí se situen en aquest cas en la mateixa regió cortical. No sempre, la reorganització implica territoris perifèrics adjacents. La desaferentització en primats o rossegadors de totes les aferències precedents del braç per seccions de les arrels dorsals fan que les antigues regions corticals de la mà i el braç s'activen amb estímuls aplicats sobre la mandíbula i la barbata fet que significa una expansió superior als 10 mm en la superfície cortical (Sanes et al 1990, Pons et al 1991). A més, mentre que després de lesions perifèriques els processos centrals de les neurones sensorials es mantenen intactes, la secció radicular produeix la degeneració de les projeccions espinals generant un "espai vacant" espinal o troncenecefàlic que afavoreix la seva ocupació per aferències de neurones intactes. Els canvis reorganitzatius no afecten només el còrtex cerebral. El nucli ventral posterior del tàlam d'algunes espècies de primats es reorganitza de manera similar al còrtex després de lesions de secció dels mitjà i el cubital (Garrathy i Kaas 1991) de manera que la representació talàmica de l'anvers dels dits de la mà respon a estímuls del dors. A nivell medul·lar, la transecció en gats de les arrels espinals causals a L4 comporta també una expansió ràpida de la representació del nucli gracil·lis del tronc de l'encèfal (Dovstrovsky et al 1976).

### 5.2.2. Mecanismes de plasticitat postlesió

Una gran quantitat de mecanismes estan implicats en la reorganització del sistema nerviós després de lesions i en la seva seqüència d'esdeveniments. Aquest operen probablement als diferents nivells de

la via motora o somatosensorial afectada incloent a més del còrtex estructures espinals, tronccencefàliques (nuclis gracilis i cuneatus) i subcorticals (nucli ventral posterior del tàlam). La desinhibició d'entrades sinàptiques silents o la potenciació d'entrades sinàptiques prèviament inefectives i el creixement de processos dendrítics i axonals i l'establiment de noves sinapsis. Les aferents terminals mostren una extensió superior a la que es manifesta realment a nivell fisiològic mitjançant l'estimulació de camps receptius. L'expressió d'algunes entrades sinàptiques està parcialment bloquejada a nivell central per introneurons inhibidors glicinèrgiques o GABAèrgiques. La desaferentització comporta l'expressió d'entrades d'intensitat subllindars per l'abolició de mecanismes inhibidors produït per la manca d'estímuls excitadors sobre els sistemes de bloqueig. Això, s'ha observat un decreixement de la expressió cortical i espinal de GABA i talàmica d'àcid descarboxil·lase 2 mesos després de lesions perifèriques de secció. En acord amb el model de sinapsi de Hebb, dues entrades sinàptiques amb descàrregues temporalment coincidents incrementen l'eficàcia sinàptica mentre que la descoordinació entre elles la redueixen. Diverses evidències indiquen que el receptor NMDA juguen un paper com a receptors de coincidència en el reforçament de determinades sinapsis per mecanismes de potenciació a llarg terme (LTP) i que en adults podria ser utilitzat per afeblir o reduir l'eficàcia en sinapsis que no correlacionen temporalment. Moltes d'aquestes connexions es mantenen funcionals però a uns nivells inferiors als necessaris per activar els elements postsinàptics. Quan per una lesió, aquests mecanismes que poden actuar sobre neurones o poblacions neuronals (Pearson et al 1987), podueixen la desaparició de les entrades dominants sensorials i el reforçament de les sinapsis més "febles" per mecanismes de LTP. Amb el temps aquestes sinapsis s'estabilitzen i estableixen un nou patró dominant d'activitat. Se sap a més que el bloqueig de receptors NMDA aboleix alguns canvis reorganitzatius espinals. En fenòmens de plasticitat a llarg terme, és molt probable que es produeixi el creixement per regeneració o col·lateralització, de noves projeccions axonals i dendrítiques que facin sinapsi amb neurones de territoris veïns. S'ha demostrat un allargament de les aferents espinals i tronccencefàliques després de lesions de compressió i amputacions (Florence i Kaas 1995) i un increment de l'expressió de GAP-43 en aferents terminals del gangli de l'arrel dorsal després d'axotomia. A més, les neurines expressen a nivell espinal receptors d'altra afinitat per a neurotrofines al temps que s'incrementa el transport cap al soma de CNTF i BDNF que s'ha relacionat amb canvis en la somatotòpia cortical de la rata. Donada la persistència d'aquests mapes aberrants, una de les qüestions més controvertides és arribar a saber si és possible reprogramar el cervell per aconseguir reeducar les funcions motores i de procesament sensorial una vegada produït el canvi de connexions perifèriques mitjançant programes de teràpia i rehabilitació (Dellon 1981, Imai et al 1991).

### 5.3 Paper de l'activitat reflexa

Els circuits espinals juguen un paper fonamental com a controladors de l'activació de diferents poblacions de motoneurons per tal de produir una seqüència coordinada de moviments en activitats complexes com l'expressió del llenguatge, la deambulació o la manipulació d'objectes. Les aferents sensorials procedents d'òrgans musculars i receptors de superfície, així com entrades supraespinals comparteixen sovint les mateixes poblacions de motoneurons i interneurons espinals, però tenen

capacitat per activar-les de manera diferent i ponderada segons cada situació. L'activació directa o indirecta de poblacions motoneuronals a partir d'entrades sensorials desencadenen les anomenades respostes reflexes, que a més de ser fonamentals com a eines de control del moviment, permeten avaluar segmentàriament a nivell clínic l'estat del sistema nerviós (Floeter et al 1999) al llarg dels diferents elements que el componen (òrgan receptor, via aferent, sinapsis espinals, via eferent i òrgans efectors). El ventall de possibles estats i de respostes que pot presentar una via reflexa és extraordinàriament elevat, si es parteix de la base que les seves sinapsis actuen com a operadors lògics regulant en funció del nivell global d'activitat que s'integra, el pas del senyal a l'element postsinàptic i la producció d'una resposta en l'òrgan efector. Així, fenòmens com la facilitació espacial produïda en disparar conjuntament dues terminals que coincideixen sobre una mateixa sinapsis, sistemes de control per gallet en els quals una entrada excitatòria i una d'inhibitòria coestimulen un mateix element postsinàptic, la facilitació temporal produïda per la suma dels PEPS generats per una única fibra aferent que descarrega de manera continuada, o els efectes de la sincronicitat o l'asincronicitat de les descàrregues expliquen aquesta gran varietat. Se sap que l'eficàcia de les sinapsis depèn en cada moment del patró d'expressió de receptors i canals iònics de cada neurona individual, la funcionalitat dels quals varia en funció del potencial de membrana i l'acció de neurotransmissors. Petites modificacions de l'estat d'algun d'aquest paràmetres o elements moleculars són suficients per produir grans modificacions del patró de descàrrega d'una neurona i en darrera instància del funcionament de la xaxa de la qual forma part (Getting 1989).

El reflexos miotàtics o d'estirament, el reflex miotàtic invers i els reflexos de retirada flexor ipsilateral i extensor contralateral són alguns dels reflexos espinals més estudiats a l'actualitat i que més interès presenten de cara al control segmentari del moviment.

### 5.3.1 El reflex d'estirament

El reflex miotàtic o d'estirament és la resposta de contracció muscular evocada per estirament del múscul. Presenta un component fàsic de curta durada i un component sostingut o tònic que és difícil d'obtenir i registrar en condicions normals. L'estirament del tendó activa les fibres musculars intrafusals dels fusos musculars i excita les aferents sensorials Ia que estableixen una sinapsis monosinàptica amb motoneurons del mateix múscul (Brown i Fyffe 1978). Després d'aquesta estimulació probablement mediada per glutamat donat que antagonistes d'aquest neurotransmissor excitatori que actuen sobre receptors NMDA i no-NMDA bloquegen la resposta (Ziskin-Conhaim 1990, Pinco i Lev-Tov 1993), una població de motoneurons que superen el llindar d'excitabilitat disparen potencials d'acció cap al múscul originant una nova però breu contracció sostinguda. Electrofisiològicament, es registra un potencial d'acció muscular compost d'amplitud menor i latència més tardana que l'ona de despolarització aferent (ona M) que s'anomena ona H (reflex de Hoffmann) i que és la plasmació en termes d'activitat muscular d'aquest reflex. Les aferents sensorials Ia sinapten preferentment sobre motoneurons del mateix múscul sobre les quals la seva acció és màxima i produeixen l'anomenada resposta H *homònima*, però al mateix temps també es projecten sobre neurones motores de músculs sinergistes produint l'anomenada resposta H *heterònima*. L'activació de

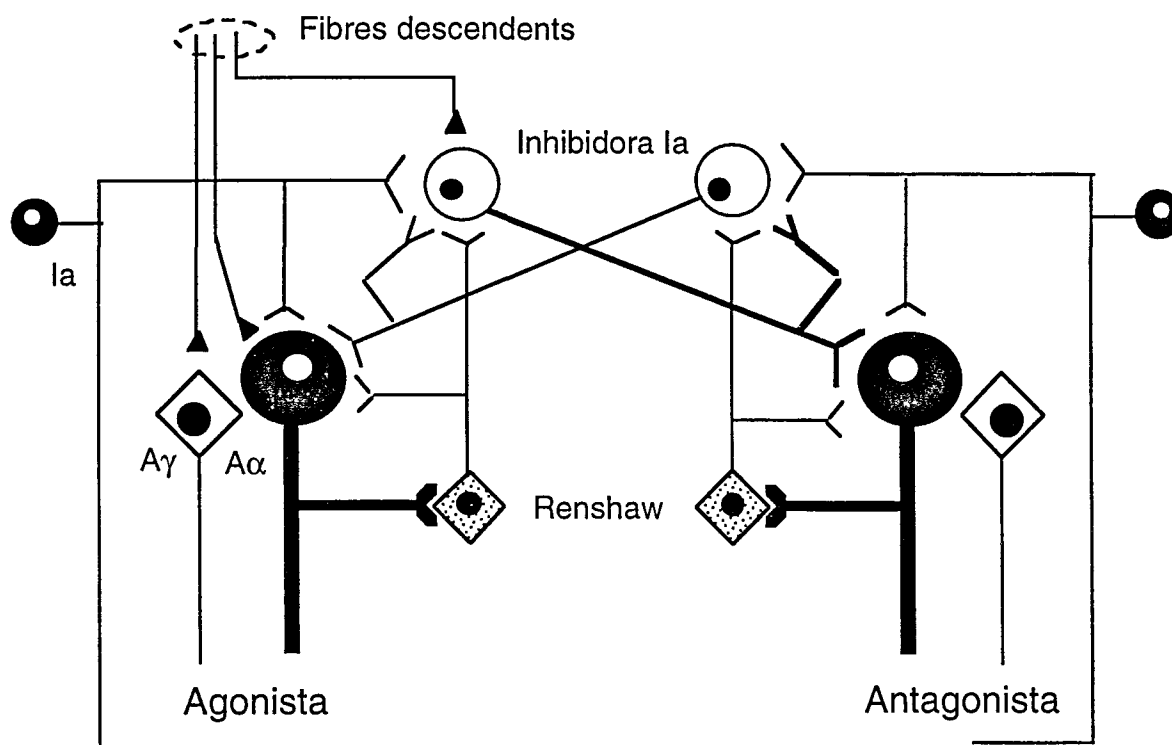


les fibres Ia dels fusos musculars produeix per mitjà d'una interneurona glicinèrgica (IaIN) la inhibició recíproca de les motoneurons dels músculs antagonistes, la qual es pot activar també per vies descendents espinals i corticals voluntàries o involuntàries reguladores de la locomoció. La interneurona inhibidora Ia (IaIN) actua com una estació de regulació sinàptica amb un ampli ventall d'efectes en funció de la sumació d'aferències segmentàries i descendents que hi afereixen (Pratt i Jordan 1987) (Fig.I.5.1). Els reflexos miotàtics poden bloquejar-se per la inhibició presinàptica sobre les aferents Ia i II (també les Ib) d'interneurones espinals que despolaritzen la membrana del botó sinàptic disminuint l'eficàcia dels mecanimes d'alliberament de glutamat quan arriba el potencial procedent dels fusos musculars. Aquests circuits que permeten bloquejar o reduir l'eficiència del reflex monosinàptic en músculs antagonistes als estimulats s'afegeixen com a mecanismes inhibitoris als propiciats per les interneurones IaIN i estan mediatos per receptors GABAA i GABAB. Durant el desenvolupament de moviments voluntaris, aquests mateixos mecanismes d'inhibició presinàptica són activats en les terminals Ia procedents de músculs en repòs durant la locomoció per l'acció de vies supraespinals (Hultborn et al 1987). En alguns casos, especialment en models espinalitzats, es pot observar una contracció continuada tònica la base neuronal de la qual és encara molt desconeguda (Liddle i Sherrington 1924). Les aferents sensorials tipus II produïrien probablement una estimulació continuada sobre les  $\gamma$ -motoneurons i diverses interneurones espinals que mediarien aquest component la hiperactivitat del qual ha estat implicat en diferents alteracions del to muscular en humans (McGrath i Matthews 1973). Existeix un circuit dedicat a la inhibició recurrent de les mateixes motoneurons activades basat en les anomenades interneurones de Renshaw. Així, col·laterals de les motoneurons especialment de la musculatura proximal exciten aquestes cèl·lules que estableixen sinapsi amb tota la població de motoneurons del múscul activat o de músculs sinergistes. La seva funció és limitar la freqüència de descàrrega de les neurones motores, reduint la seva susceptibilitat a senyals activadores; a més el seu nivell d'excitabilitat pot ser regulat per projeccions descendents durant la locomoció. Al mateix temps la seva activitat inhibidora mediada per glicina i GABA i proporcional al seu grau d'activació, actua preferentment sobre els músculs sinergistes a l'activitat generant una certa "inhibició lateral" que exagera les diferències d'activació entre motoneurons actives i quiescents (Hultbor et al 1998).

### 5.3.2 Reflex miotàtic invers

El reflex miotàtic invers resulta de l'activació de les fibres Ib procedents dels òrgans tendinosos de Golgi localitzats als tendons dels músculs i la seva funció és mantenir constant la tensió muscular, evitar les ruptures fibril·lars o tendinoses i regular el grau de força en moviments fins. La tracció sobre el tendó produïda durant la contracció muscular activa aquestes fibres aferents inhibidores produint a través d'una interneurona inhibidora (IbIN) la desactivació de les motoneurons del múscul homònim i els seus sinergistes. Simultàniament i per una via dissinàptica també produeix l'activació de la musculatura antagonista. Les interneurones IbIN reben també *inputs* convergents excitatoris procedents de les fibres Ia. A diferència dels fusos musculars, els òrgans tendinosos de Golgi no tenen mecanismes per alterar la seva sensibilitat durant la contracció, raó per la qual són les aferències Ia que es projecten sobre la interneurona IbIN l'encarregat de regular-la. Al mateix temps,

però per mitjà de la inhibició presinàptica de les aferents Ib per fibres descendents o interneurons locals les motoneurons poden alliberar-se en determinades situacions d'aquesta inhibició i desenvolupar la màxima força possible (McCrea et al 1980).



**Fig.I.5.1.** Circuits locals i descendents de control sobre les motoneurons  $\alpha$  i  $\gamma$  i les interneurons Ia. Les interneurons Ia desenvolupen funcions d'integració de senyals de diferents orígens. El balanç d'activitat dels músculs agonistes i anatagonistes d'una mateixa articulació depèn de les inmhibicions recíproques de les inter neurones Ia i de projeccions supraespinals (adaptat de Canedo 1998).

### 5.3.3. Els reflexos de retirada

L'any 1910, Sherrington va descriure per primera vegada l'estimulació de la pell, nervis mixtes o arrels dorsals en animals espinalitzats produïa una combinació de contracció de musculatura flexora i relaxació de l'extensora, el predomini del to extensor a l'extremitat contralateral i l'existència d'efectes rebot "extensors" en ambdues extremitats després de la flexió inicial (Sherrington 1906, 1910). Aferents sensorials musculars (tipus II i III), propiceptives articulars i cutànies de baix i alt llindar, totes elles agrupades sota la denominació d'aferents del reflex flexor (FRAs) la funció original de les quals és proveir d'informació la medulla espinal i les vies ascendents, poden desencadenar reflexos de retirada. Tot i que la seva funció primordial és retirar ràpidament l'extremitat d'una possible font d'estimulació dolorosa mitjançant una activitat flexora sostinguda, resposta que és sempre prioritària, també es poden evocar components reflexos de durada menor per mitjà d'estímuls sensorials que no són potencialment nocius. Aquests últims semblen ser fonamentals com a generadors d'activitat de locomoció (Holmberg i Schouenborg 1996b). Es tracta de circuits polisínàptics amb interneurons excitadores i inhibidores sobre les quals es té encara poca informació, especialment del funcionament de les interneurons que serveixen com a estacions de convergència de fibres còrtico, rubre, vestibulo

i propiespinals. Es coneix que diferents subpoblacions d'interneurons estimulades per terminals sensorials poden produir d'una banda flexió o extensió per la via normal i al mateix temps activar circuits reflexos alternatius que modifiquen o regulen la resposta principal (Lundberg et al 1987). D'aquesta manera, les projeccions descendents poden actuar sobre l'excitabilitat d'aquestes neurones seleccionant en cada moment les subpoblacions que produeixen la resposta desitjada i inhibint les alternatives. També se sap que subpoblacions específiques d'interneurons inhibidores podrien participar en el processament d'informació multisensorial perifèrica i reforçar el desenvolupament de determinats moviments voluntaris o estereotipats que hagin estat prèviament seleccionats (Lundberg et al 1979).

Així, en la locomoció existiria un circuit bàsic consistent en dues subpoblacions d'interneurons que s'inhibirien alternativament de manera recíproca; una rebria aferències sensorials ipsilaterals que activarien respostes flexores, mentre que d'altres es nodririen d'aferents de l'extremitat contrària amb capacitat per produir respostes extensores. Tot aquest procés s'acabaria refinant i adaptant a les variacions a partir de les aferències sensorials perifèriques. En animals espinalitzats tractats amb L-DOPA s'observa la desaparició de components reflexos de latència curta, mentre que prenen relleu tota una sèrie de respostes de llarga latència que es *desenmascaren* amb la lesió amb capacitat per actuar com un generador de moviments de flexió-extensió alternatius. En malalts medul·lars també s'ha posat de manifest l'existència d'aquests circuits que estimulats farmacològicament o per rehabilitació podrien servir per recuperar una certa activitat locomotora (Dietz i Colombo 1994). L'evocació de reflexos de retirada a partir de l'estimulació no dels axons sensorials sinó dels diferents subtipus de receptors sensorials perifèrics posa de manifest una elevada especificitat de camps receptors. Així, per posar un exemple, l'estimulació de la pell del dors del peu que es produeix quan ensopeguem amb algun obstacle genera exclusivament en la fase de flexió de l'extremitat (en fase d'extensió està inhibida), una resposta reflexa específica d'aixecament de l'extremitat per evitar la caiguda (Forssberg 1979). Respostes de retirada de determinats músculs flexors s'obtenen a partir de l'estimulació de regions cutànies molt ben delimitades mentre que les aferents que es projecte fora poden conduir o bé a l'activació d'altres músculs sinèrgics o bé a la inhibició de motoneurons flexores (Holmberg i Schouenborg 1996b).

#### 5.3.4 Alteracions de l'activitat reflexa després de lesions

La integració o transformació sensori-motora depèn de representacions de la superfície corporal definides a diferents nivells del sistema nerviós central. Després de lesions del sistema nerviós perifèric les representacions queden modificades per la pròpia lesió, canvis en la reinnervació perifèrica i canvis en el patró sinàptic de les aferents lesionades i intactes (Shortland i Fitzgerald 1994). Per una banda, la reinnervació cutània depèn de l'acció combinada de la innervació colateral per part de terminals intactes i de la regeneració del fascicle nerviós afectat que rarament ocupen les seves localitzacions originals (Horch 1979). D'altra banda, les mateixes lesions perifèriques produeixen una reorganització central donant lloc a canvis en les làmines espinals de projecció de les aferents sensorials (Shortland i Fitzgerald 1994) i una alteració de la somatotòpia. Aquestes respostes

reflexes presenten una organització "modular" donat que cadascun d'ells controla un grup definit de músculs sinèrgics i antagonistes (Schouenborg et al 1995). En rates postnatsals els reflexos de retirada es mostra funcionalment desadaptats al naixement, adquirint la seves especificitats funcionals i camps receptors a les 2-3 setmanes i durant aquest temps la connectivitat inapropiada és silenciada o eliminada mentre es desenmascara o es generen les vies sinàptiques adequades (Holmberg i Schouenborg 1996a). En animals adults, la localització i distribució de la sensibilitat als camps receptius cutanis excitatoris reflecteixen el patró de retirada causat pel múscul efector, de manera que la resposta reflexa màxima de retirada d'un determinat múscul s'obté per estimulació nociceptiva de la regió cutània que més s'allunya de la font dolorosa amb l'estimulació (Holmberg i Schouenborg 1996b). La lesió de la via perifèrica aferent i la seva posterior reinnervació produeix una sèrie de mecanismes reorganitzatius a nivell espinal, que permeten restituir en animals postnatsals un patró de camps receptius molt semblants als originals, posant de manifest que el potencial plàstic espinal en animals en desenvolupament és capaç de compensar els dèficits i errors d'especificitat de la reinervació. Sembla que aquesta capacitat és dependent de l'edat, de tal manera que en animals adults l'adaptació a la lesió genera camps més imprecisos (Holmberg i Schouenborg 1996b). Donat a més que l'especificitat i la intensitat de contracció reflexa muscular es troba "registrat" a nivell dels seus camps receptors, tot fa pensar que el *feedback* sensorial indirecte produït per la contracció muscular és determinant per a definir i afinar els circuits d'activitat reflexa en el desenvolupament postnatal. El mateix mecanisme podria explicar la bona adaptabilitat i recuperació dels territoris receptors que s'observa després de lesions que generen de ben segur errors de reinnervació (Holmberg i Schouenborg 1996b). A més, per colateralització de terminals no afectades per la lesió amb capacitat per reinnervar les regions cutànies desaferentitzades i per establir amb les interneurons adequades connexions sinàptiques funcionals a nivell espinal, els animals podrien recuperar una font d'aferències sensorials equivalent a l'original per reestablir un mapa funcional d'activitat reflexa compatible amb el desenvolupament de la funció (Schouenborg et al 1994).

## 6. La funció global de locomoció

La finalitat de la locomoció és traslladar el cos utilitzant la força muscular produïda, de manera, rítmica pels músculs flexors i extensors dels membres inferiors en animals bípedes i de les quatre extremitats en els quadrúpedes. Segons l'espècie animal, la locomoció es manifesta amb modalitats com nedar, caminar, saltar, grimpar o volar (Canedo 1998, Floeter 1999). És un dels actes voluntaris més automatitzats que existeixen i no necessita ni de l'activitat reflexa ni de les aferències sensorials per produir-se (Bussel et al 1989). Tot i això, en absència d'entrades sensorials, la locomoció es experimenta una disminució de la coordinació i del grau del sinergisme motor, fet que demostra la importància de les aferències procedents de receptors musculars i terminacions lliures i formacions especialitzades de la pell i la seva sinapsi amb motoneurons espinals encarregades de mediar una resposta de moviment.

### 6.1. Fases del moviment de deambulació en quadrúpedes

En animals quadrúpedes com la rata, la deambulació s'inicia la fase de recolzament (*stance phase*) en la qual es colpeja amb el taló la superfície de recolzament i es pren impuls. Al llarg d'aquest període el pes del cos es desplaça de la part posterior del peu a la porció anterior. La fase d'alçada (*swing phase*) comença quan es perd el contacte entre els dits i el sòl i l'extremitat es desplaça cap endavant (Hruska et al 1979). De manera general, els músculs flexors s'activen fonamentalment durant la fase d'alçada i els extensors durant la de recolzament, encara que els patrons individuals d'alguns músculs poden ser més complexos activant-se diverses vegades al llarg d'un mateixa fase o només en una determinada part d'aquesta. La complexitat de la locomoció pot ser descrita en termes de durada d'un cicle, proporció relativa de les fases d'alçada i recolzament i coordinació de fases entre les dues o quatre extremitats (Hruska et al 1979, Wasserschaff 1990). En deambulacions lentes o moderades amb duracions llargues del cicle complet (en rates entre 20-80 cm/s), les dues extremitats posteriors es troben simultàniament en contacte amb el sòl durant una determinat període i la fase d'extensió es perllonga de tal manera que les fases d'extensió d'extremitats oposades se superposen. A mesura que la velocitat de marxa augmenta (>80 cm/s) la fase d'extensió s'escurça reduint el temps tota del cicle fins arribar al punt en el qual no s'observa contacte simultani de les extremitats posteriors sobre la superfície (Hruska et al 1979).

### 6.2. Mecanismes espinals de la locomoció

Els circuits neuronals responsables es troben situats a la medul·la espinal donat que se sap que l'espinalització i la secció de les columnes dorsals no impedeix el desenvolupament d'un patró rítmic alternat d'activació de grups musculars agonistes i antagonistes. Les motoneurons espinals que duen a terme aquesta activació rítmica s'anomenen generadors centrals de pautes. Experimentalment, a més la locomoció es pot activar per estimulació elèctrica de diferents zones supraespinals com el nucli subtalàmic, el centre locomotor mesencefàlic i el centre locomotor del pont. Aquests sistemes descendents influeixen sobre l'activitat de les interneurons que conformen els generadors de pautes espinals i n'activen el seu funcionament. Alguns dels models computacionals de centres generadors

de patrons es concebeixen com a oscil·ladors (amb capacitat d'activació i inhibició recíproca) per a cada grup de músculs sinergistes que realitzen accions oposades a l'entorn de la mateixa articulació. Els neurotransmissors glicina com a activadora i el GABA com a regulador semblen estar implicats en aquestes connexions bilaterals (Boothby i Roberts 1992). La connexió entre els diferents oscil·ladors d'una mateixa extremitat permet realitzar el joc alternat de moviments de flexió-extensió, mentre que la connectivitat entre oscil·ladors de les quatre extremitats en el cas dels animals quadrúpedes permet el desenvolupament coordinat de la locomoció global (Grillner 1985, Grillner et al 1995).

Recentment, s'han començat a postular el possible paper de modificacions cícliques de les propietats d'excitabilitat de la membrana d'algunes neurones individuals com a dinamitzadores del centre generador de la locomoció. Així s'ha vist que l'administració d'aminoàcids excitatoris a medul·la espinal de vertebrats, especialment l'NMDA, genera un patró de despolarització rítmica i oscil·lant d'algunes neurones al mateix temps que s'ha comprovat que l'administració de bloquejants d'aquest neurotransmissor aboleix el patró generador locomotor evocat per estimulació de nuclis troncocefàlics (Arshavsky et al 1993). L'NMDA modifica les conductàncies voltatge-dependents produint oscil·lacions rítmiques del potencial de membrana i a la vegada, incrementa l'excitabilitat de determinats circuits, permetent que en fases rítmiques, les entrades sinàptiques puguin generar respostes més acusades (Arshavsky et al 1993). Els canals NMDA, que estan tancats per un àtom de magnesi, s'obren i permeten l'entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  sempre i quan coincideixi la despolarització cel·lular amb l'alliberament per la terminal presinàptica de glutamat, raó per la qual són denominats *detectors de coincidència*. L'increment del  $\text{Ca}^{2+}$  intracel·lular despolaritza la cèl·lula i dona lloc a potencials d'acció mediat per  $\text{Ca}^{2+}$  o  $\text{Na}^+$ . Quan la concentració de  $\text{Ca}^{2+}$  intracel·lular augmenta per damunt de  $10^{-6}$  molar la cèl·lula es repolaritza per mitjà de canals de  $\text{K}^+$  i es reestableix el blocatge del canal NMDA pel magnesi de manera que el cicle recomença generant una activitat rítmica oscil·latòria. Hi ha un gran nombre de fàrmacs com la serotonina, l'acetilcolina, la dopamina i els antagonistes dels opioïdes, que poden induir o modular l'activitat rítmica a la medul·la espinal.

### 6.3. Coordinació i control de la locomoció

La coordinació de la deambulació depèn té lloc gràcies a activitats específiques locals de la medul·la espinal i descendents del tronc de l'encèfal, el cerebel i el còrtex cerebral motor. Aquestes contribucions permeten l'iniciació de la locomoció, la coordinació dels patrons d'activació muscular, respostes a les perturbacions i l'elaboració de conductes de compensació posatural. Les senyals sensorials, si bé no són necessaris per a estimular els centres generadors, són essencials per generar les correccions motores necessàries durant la marxa al temps que també intervenen en el refinament del moviment (Brown 1911). Si l'extremitat percep la presència d'un obstacle en la seva fase d'alçada realitza una flexió adicional per a superar-lo, mentre que si es troba en la fase d'extensió la resposta serà d'extensió adicional. Aquestes respostes són degudes a l'activació de receptors cutanis i a l'evocació de respostes reflexos altament específiques mediatades per interneurons espinals. Les aferents sensorials també aporten informació específica als centres generadors que modifiquen alguns aspectes de la deambulació. Així, mentre les aferències mediatades per aferències tipus I excitadores

afecten la durada de les dues fases del cicle, els circuits de les cèl·lules de Renshaw o de les interneurons inhibidores Ia afecten l'amplitud de la resposta motora. La deambulació també depèn en cadascun dels grups de músculs sinergistes i antagonistes per les aferències sensorials procedents dels fusos musculars (reflexos miotàtics), els òrgans tendinosos de Golgi (reflex miotàtic invers), mecanismes pels quals es regula el reclutament motoneuronal adequat i el to muscular òptim, i de diferents tipus de receptors cutanis (reflexes de retirada i extensor creuats) que són entrades que poden regular el centre espinal generador de pautes (Zehr et al 1997, Carrier et al 1997).

#### **6.4. Efecte de les lesions perifèriques sobre l'activitat locomotora**

Les lesions del sistema nerviós perifèric produeixen en primer lloc la desconexió i la pèrdua de control neural sobre totes aquelles estructures diana musculars, sensorials i del sistema nerviós autònom que eren innervades pels axons afectats. En segon lloc, la desconexió de les neurones axotomitzades, motores i sensorials, dels circuits reflexos espinals que desenvolupen funcions de control del moviment. En tercer lloc, i com a conseqüència de l'aïllament glial i les alteracions de les propietats cel·lulars i sinàptiques, es produeixen alteracions dels processos normals de transmissió de potencials d'acció a través d'axons i dendrites, modificacions del potencial en repòs transmembrana i del llindar d'excitabilitat cel·lular. La recuperació de la funcionalitat global d'una activitat tan complexa com la deambulació no es garanteix només en cas que hi hagi una bona supervivència neuronal post-axotomització i una regeneració i elongació axonal a través de la zona de lesió. Així, és un requisit indispensable que la connexió perifèrica i central de les neurones afectades sigui el màxim d'específica possible per tal de rearticular adequadament no només les sinapsis amb els òrgans diana sinó també el funcionament de circuits espinals motors i sensorials que com s'ha pogut veure resulten essencials per a la generació, el control i la coordinació del moviment de deambulació. Finalment, fins i tot havent assolit una reconnectivitat perifèrica i central que si bé no és idèntica a l'original, sí que resulta compatible amb el desenvolupament de la funció, és necessari que des del punt de vista fisiològic les neurones i les sinapsis que les connecten funcionin de manera individual amb pautes que possibilitin el desenvolupament normal de la funció global.

#### **6.5. Quantificació de la recuperació funcional global després de lesions**

La majoria d'estudis que analitzen els diferents graus de reinnervació perifèrica i l'eficàcia de diferents tractaments analitzen de manera separada la *recuperació* per mitjà de proves histològiques (Giannini et al 1989, Gómez et al 1996, Verdú et al 1997) o electrofisiològiques (Navarro et al 1994, Navarro et al 1996, Butí et al 1996) que no sempre correlacionen *a posteriori* amb els efectes reals d'aquestes variables sobre la funció global. Els mètodes histològics basats en la quantificació en l'extrem distal del fascicle nerviós del nombre d'axons, el diàmetre i perímetre axonal, la densitat axonal per superfície de nervi, la distribució axonal segons diàmetre, i la relació de diàmetres entre l'àrea coberta de mielina i l'àrea pròpiament axonal, suposa que un nombre elevat d'axons, de gruixària considerable i per tant madurs i ben mielinitzats, és indicatiu d'una òptima regeneració i recuperació funcional després de lesions (Giannini et al 1989, Gómez et al 1996). En primer lloc, la constatació estructural de l'existència d'axons no pot fer pressuposar que tots ells han arribat a establir sinapsis amb

estructures distals ni tampoc que són actius en la transmissió de potencials d'acció bioelèctrics. En relació a les proves electrofisiològiques, la mesura de l'amplitud de l'activitat muscular (PAMC) o de l'activitat nerviosa a nivell digital (PANC) evocada per estimulació elèctrica del nervi afectat per damunt del punt de lesió indica que els axons han regenerat, que s'han remielinitzat assolint un nivell de velocitat de conducció determinat i que han format sinapsis actives amb òrgans diana distals. Però això no implica que la reinnervació hagi estat *qualitativament* correcta. Així, un múscul reinnervat per una majoria d'axons que corresponien a un múscul antagonista presentarà una amplitud del PAMC i un temps de latència semblant al d'un múscul correctament innervat; per contra la recuperació final de la funció global serà inadequada.

Complementar aquest conjunt de dades indirectes amb una prova que analitzi quantitativament la conducta global en la qual el nervi regenerat participa, és essencial per obtenir una idea adequada i clínicament extrapolable de l'efectivitat de la reinnervació. L'establiment de proves d'avaluació de funcions globals en condicions fisiològiques per a l'animal i que siguin quantitatives i repetitives no resulta, però, senzill. De Medinaceli i col·laboradors (1982) van desenvolupar un mètode per avaluar les variacions del patró de marxa d'animals rossegadors afectats per lesions dels nervis de l'extremitat posterior, per mitjà de l'enregistrament de les petjades produïdes per l'animal en caminar per un passadís allargat. L'aplicació d'aquest mètode permet conèixer en quina mesura la reinnervació distal i la reconnectivitat central permeten la recuperació de l'activitat locomotora i pot detectar casos amb una regeneració i reinnervació que segons els mètodes histològics i electrofisiològics seria excel·lent, però que en realitat mostren una recuperació integral nul·la o mínima.





## **II. Objectius**

## Objectius generals

Per tal d'assegurar una bona recuperació funcional després de lesions del sistema nerviós perifèric s'han d'acomplir una sèrie de requisits previs:

- a) Que les neurones axotomitzades sobrevisquin a la lesió.
- b) Que hi hagi regeneració axonal des del punt de lesió pel nervi distal fins a reinnervar òrgans diana.
- c) Que els axons reinnervin les estructures perifèriques que originalment innervaven.
- d) Que la neurona axotomitzada reestableixi el patró de connexions espinals original o un de compatible amb el desenvolupament de la funció.
- e) Finalment, que la integració dels processos morfològics i fisiològics comporti el restabliment de respostes fisiològiques adequades.

Aquest treball es proposa avaluar el paper que juga cadascun d'aquests factors en la capacitat de recuperació funcional global després de lesions del nervi perifèric de diferent gravetat i de reparacions convencionals per sutura o autoinjert respecte a la tubulització.

En aquest marc general s'han abordat els següents objectius específics

### **1. Comparar els nivells de recuperació funcional aconseguits després d'efectuar diversos tipus de lesions i reparacions del nervi perifèric.**

L'aplicació de tècniques d'avaluació funcional *in vivo* permet efectuar un seguiment quantitatiu de la recuperació després d'una lesió i del grau d'èxit aconseguït per la reparació. Les lesions de nervi són reparades clàssicament per sutura directa dels extrems nerviosos o bé, quan es genera una separació entre ells, amb la interposició d'un empelt nerviós. Tant en distàncies curtes, produïdes per retracció després de la secció, com en distàncies llargues, derivades de la resecció, l'ús de guies tubulars podria ser un mètode alternatiu als tradicionals. Aquesta tesi es planteja quantificar la recuperació de diferents funcions neurals després d'una lesió nerviosa i comparar l'efectivitat terapèutica de la sutura i l'injert respecte de la tubulització amb guies convencionals de silicona i de noves guies reabsorbibles.

### **2. Comparar l'evolució temporal de diferents paràmetres neurofisiològics relacionats amb la regeneració de fibres nervioses motores, sensorials, nociceptives i sudomotores.**

Els nervis perifèrics consten de diferents tipus d'axons que es poden dividir, segons la funció, en motors, sensorials i autonòmics. Després d'una lesió que implica la pèrdua de continuïtat del nervi no tots els axons presenten la mateixa capacitat de regenerar i reinnervar estructures distals. Els axons amb cons de creixement més actius regeneren més ràpidament, però amb un grau d'especificitat menor que aquells que evolucionen amb lentitud, els quals causen fenòmens d'hiperinnervació, poliinnervació i innervació aberrant. En aquest treball es pretén estudiar amb proves específiques l'evolució de la regeneració i la reinnervació de fibres motores, sensorials, nociceptives i autonòmiques sudomotores en el mateix model animal.

**3. Comparar el grau de reinnervació funcional sensòrio-motora, amb el nivell de recuperació del patró global d'activitat locomotora**

Malgrat que la major part d'estudis experimentals sobre la regeneració de lesions del sistema nerviós perifèric es basen en l'anàlisi de paràmetres histològics i/o fisiològics individuals, només l'estudi de conductes motores o sensorials complexes en les quals participa el nervi afectat, pot donar una idea clara de la recuperació efectiva assolida per la terapèutica estudiada. En aquest apartat es proposa avaluar la recuperació del patró de locomoció després de diferents lesions i reparacions i comparar-la amb els nivells de reinnervació obtinguts.

**4. Estudiar l'especificitat de la reinnervació de fibres nervioses motores, sensorials i autonòmiques després de diferents tipus de lesions i reparacions del nervi perifèric.**

Després d'una lesió, encara que la regeneració sigui aparentment exitosa, són freqüents les alteracions del patró normal de reinnervació de les dianes distals, que són causants d'incapacitats funcionals. Els fenòmens d'inespecificitat podrien explicar la manca d'una bona recuperació de la funció global en lesions que permeten una bona regeneració. En aquest treball es voldria avaluar, mitjançant mètodes funcionals i morfològics, l'especificitat anatòmica i fascicular de la reinnervació de fibres nervioses motores, sensorials i autonòmiques després de diferents tipus de lesions i reparacions del nervi perifèric, i relacionar els seus resultats amb la recuperació de la funció global.

**5. Estudiar els canvis de les respostes reflexes espinals després de lesions i reparacions del nervi perifèric.**

A més dels fenòmens distals al punt de lesió, les neurones axotomitzades per la lesió presenten una sèrie de canvis estructurals i funcionals a nivell del seu soma i arbre dendrític. Les dendrites que la connecten sinàpticament es retrauen i es produeix el seu aïllament de circuits propioespinals i suprasegmentaris. Com a resultat d'aquest isolament i de canvis moleculars del nombre i la sensibilitat dels canals iònics, la neurona presenta un estat d'hipèrexcitabilitat que afecta el funcionament dels circuits espinals en els quals participa com a element aferent o eferent. Aquest estudi es proposa avaluar les respostes reflexes monosinàptiques (resposta H) i polisínàptiques (reflex de retirada) després de lesions i la seva evolució segons el tipus d'arc reflex, la gravetat de la lesió i el nivell final de reinnervació final assolit.



### **III. Material i Mètodes**

## 1. Model animal

En tots els experiments, s'han utilitzat rates femelles albines *Sprague-Dawley* d'edat compresa entre 10 i 12 setmanes en el moment de ser operades i de pes mitjà d'aproximadament 260 g ( $263\pm 4$ ). Els animals han estat subministrats pel Servei d'Estabulari de la Universitat Autònoma de Barcelona procedents de la seva colònia interna. Una vegada identificats per mitjà d'orificis practicats a les orelles per tal d'efectuar seguiments individualitzats, els animals han estat establats en gàbies de polipropilè (model 500, Panlab), amb unes mides de 26 x 72 x 14 cm. El sòl de la gàbia ha estat cobert amb encenalls tous de cel·lulosa-lignina (Ultrasorb Panlab). L'espai d'establació ha estat mantingut sota condicions controlades de temperatura i humitat ( $21\pm 2^\circ\text{C}$ ), ventilació activa d'aire i un cicle de 12 hores de llum (de 8:00 am a 8:00 pm). Els animals han tingut accés a menjar i beguda *ad libitum*. L'aliment subministrat s'ha basat en un pinso compost que conté tots els elements necessaris pel seu manteniment (dieta A04, Panlab), mentre que la beguda ha consistit en aigua corrent. Les condicions d'establació i experimentació han tingut en compte en tot moment les directrius europees (86/609/CE, DOCE nº L 358/1 de 18-12-1986) i les normatives del govern espanyol (R.D 223/1988, BOE nº67 de 18-3-1988) i de la Generalitat de Catalunya (lleí 5/1995, DOG nº 2073 de 10-7-1995 i decret 2014/1997, DOG nº 2450 de 7-8-1997) sobre tractament d'animals d'experimentació.

## 2. Procediments quirúrgics

Abans d'iniciar els procediments quirúrgics, s'anestèsien els animals amb pentobarbital sòdic (Sigma) preparat a una concentració de 40 mg/ml i administrat per via intraperitoneal a una dosi de 40 mg/kg. Una vegada comprovat que l'animal no presenta respostes a estímuls tàctils ni nociceptius es procedeix a afaitar el pèl de la pota posterior dreta i a desinfectar-la amb una sol·lució de povidona iodada. Posteriorment es fixa l'animal amb cinta adhesiva sobre d'una placa quirúrgica en posició de decúbit supí i amb la pota a intervenir estirada, formant un angle de  $45^\circ$  respecte de l'eix longitudinal del cos. Tots els procediments quirúrgics es desenvolupen sota condicions d'asèpsia, utilitzant instrumental de microcirurgia (FST, Heidelberg) i sota lupa estereoscòpica (Olympus S40/46) amb il·luminació per llum freda (RAYPA F-150).

### *Lesió del nervi ciàtic*

Es practica una incisió cutània a nivell de la cara lateral-dorsal de la cuixa al llarg de la línia que va del trocànter major del fèmur al genoll. Una vegada separada la pell s'impregna la fàscia amb solució de bupivacaïna (0,75%). Seguidament es practica la secció longitudinal del múscul *biceps femoris* per accedir a la fossa poplítica i poder visualitzar el tronc del nervi ciàtic. A continuació es dissequen les adherències i el teixit connectiu que envolta el nervi ciàtic fins alliberar-lo. Abans de procedir a la lesió s'aplica tòpicament sobre el nervi ciàtic a nivell de la fenedura ciàtica 0,1 ml de bupivacaïna, per tal de bloquejar la conducció d'impulsos en direcció proximal. Les lesions del ciàtic es realitzen en tots els casos en un punt situat a una distància de 90 mm respecte de la punta del 3r dit de la pota

posterior dreta de l'animal, a fi d'assegurar en tots els animals dels grups experimentals una distància equivalent per la regeneració axonal fins les seves dianes distals. Minuts després del bloqueig anestèsic, es procedeix a la lesió per compressió o per secció de la totalitat del tronc ciàtic i, si s'escau, a la seva reparació immediata segons els diferents grups experimentals. Finalment, es sutura el pla muscular amb punts de sutura de 5-0 (Alcon) i el pla cutani amb punts de sutura de 2-0 (Alcon). La zona de sutura es desinfecta amb sol·lució iodada. Després de l'operació l'animal és mantingut a temperatura constant i controlat fins a la desaparició dels efectes de l'anestèsia.

### *Resecció del nervi safè*

Una vegada completada la cirurgia del nervi ciàtic, els animals són col·locats en posició de decúbit pron sobre la placa quirúrgica. Es practica una incisió cutània a nivell de l'espai femoral fins a visualitzar el paquet vàsculo-nerviós conformat per les venes i l'artèria femoral i el nervi safè. Amb unes pinces microquirúrgiques se separa el nervi dels vasos sanguinis al llarg d'un segment del seu trajecte i s'aplica un petit volum (0,1 ml) de bupivacaïna (0,75%) en el seu segment més proximal per bloquejar la conducció. Després d'uns minuts es resecta un segment ampli de nervi safè (d'entre 5 i 8 mm), a fi i efecte d'aconseguir una denervació total de l'extremitat posterior operada per sota del genoll i evitar que axons d'aquest nervi puguin projectar col·laterals sobre el territori ciàtic denervat i donar lloc a evidències falsament positives de reinnervació. Amb una sutura cutània de 5-0 es tanca el pla cutani i es desinfecta la incisió amb sol·lució iodada.

## **2.1. Tipus de lesions nervioses i reparacions**

### *Lesió fantasma*

Aquest tipus de lesió ha consistit bàsicament en la dissecció i alliberament del nervi ciàtic de les seves adherències, sense induir cap tipus de lesió sobre ell.

### *Compressió nerviosa*

La compressió nerviosa (*crush*) s'ha dut a terme per pressió mecànica del nervi ciàtic utilitzant unes pinces microquirúrgiques (Dumont nº 5). La compressió del nervi s'ha repetit tres vegades durant 30 segons en tres orientacions diferents per assegurar la lesió de tots els axons del nervi ciàtic. Abans de suturar la ferida, s'ha estimulat mecànicament l'extrem distal al punt de compressió per tal de verificar que la denervació ha estat completa. Aquest tipus de lesió no rep cap mena de reparació.

### *Secció nerviosa i la seva reparació*

La secció nerviosa consisteix a practicar un tall que abarca la totalitat del tronc del nervi ciàtic per mitjà d'unes estisores microquirúrgiques (Vannas). La retracció elàstica dels segments del nervi, induïda per les beines connectives, deixa entre els extrems un espai de separació (*gap*) d'entre 3 i 4 mm. Aquest tipus de lesió ha estat reparada utilitzant diversos procediments, definint els grups experimentals:

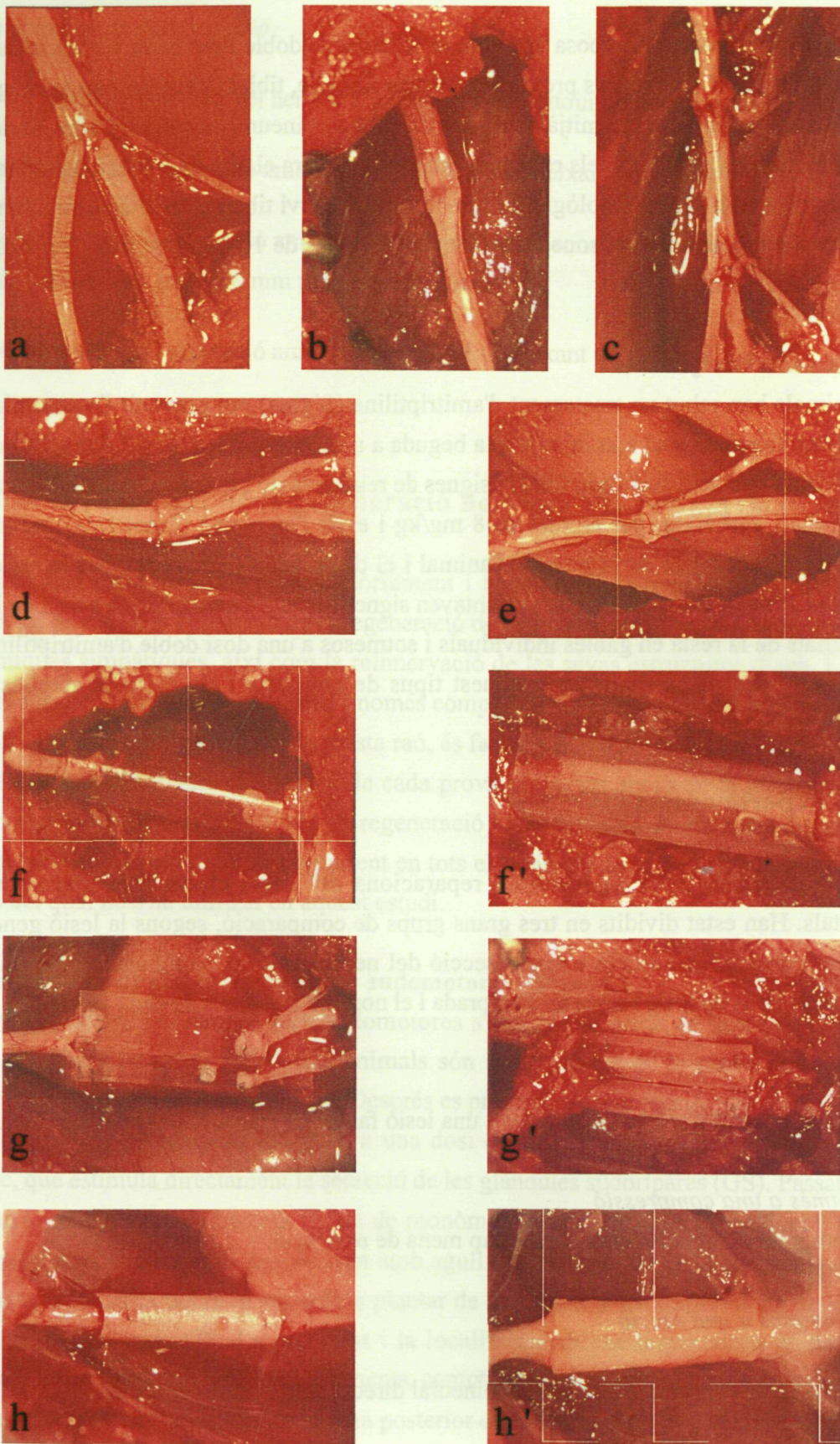


- a) *Sutura fascicular directa*: s'aproximen els extrems del nervi seccionat i es fixen mitjançant tres punts de sutura epineural amb fil monofilament de 10-0 i agulla no traumàtica (Alcon) en diferents angles del pla de secció. Les sutures travessen en primer lloc l'epineuri de l'extrem proximal i a continuació l'epineuri del segment distal, per acabar anusant-se tres vegades. En la sutura epineural s'ha procurat aconseguir sempre la màxima coaptació fascicular dels segments, en particular coaptant els fascicles tibial, peroneal i sural.
- b) *Sutura fascicular creuada*: Es dissequen i separen els dos grans fascicles que conformen el nervi ciàtic a nivell de la cuixa, nervis tibial i peroneal, des del punt de bifurcació i fins arribar al punt establert de lesió. A continuació es seccionen ambdós fascicles, i se suturen els seus extrems de manera creuada per mitjà de dos punts epineurals de sutura per cada fascicle amb fil de 10-0. D'aquesta manera es sutura l'extrem proximal del fascicle tibial a l'extrem distal del peroneal i inversament, l'extrem proximal del fascicle peroneal a l'extrem distal del tibial.
- c) *Tubulització troncular*: mitjançant un únic punt de sutura de 10-0 es sutura cada extrem del tub als corresponents extrems del nervi seccionat. Les sutures travessen de fora a dins la paret del tub i posteriorment de dins a fora l'epineuri de l'extrem nerviós (Seckel et al 1984). Una vegada fixada la sutura proximal, es mesurat sota lupa estereoscòpica amb una regleta microquirúrgica (Stoelting) la distància o *gap* entre els extrems de 4 mm, abans de procedir a la sutura distal. Finalment s'omplenat l'interior del tub de silicona amb sèrum fisiològic estèril. En la fixació dels extrems nerviosos al tub es procurat mantenir l'orientació de cada fascicle i del tronc nerviós. El tub emprat és de silicona (Dicoinsa, Barcelona), de 2 mm d.i., 0,5 mm gruix i 6 mm de longitud, i prèviament s'ha esterilitzat amb etanol de 70° i radiacions ultraviolades.

#### *Resecció nerviosa i la seva reparació*

Una vegada realitzada la secció del nervi ciàtic, es realitza una segona secció distal per resecat un segment deixant un espai de separació de 8 mm de longitud, mesurat amb una regleta microquirúrgica. Aquesta lesió ha estat reparada pels següents procediments:

- a) *Autoinjert del segment nerviós resecat*: el mateix segment de nervi ciàtic resecat s'interposa entre els dos extrems seccionats, mitjançant la sutura de l'empelt a l'extrem distal i al proximal amb tres sutures epineurals de 10-0. Es procurat també conservar la orientació de l'injert en relació als seus extrems proximal i distal agafant com a orientació els *vasa nervorum* superficials i els fascicles.
- b) *Tubulització troncular*: mitjançant un punt de sutura de 10-0 es sutura cada extrem del tub als extrems del nervi, tal com s'ha descrit anteriorment. Es verificat la mesura de 8 mm del *gap* generat entre els extrems del nervi. Els tubs emprats han estat de silicona (2 mm d.i., 0,5 mm gruix, 10 mm longitud) o de poli-L-lactat-ε-caprolactona d'alta permeabilitat (PLC; Novamont, Novara) (2 mm d.i., 0,25 mm gruix, 10 mm longitud).



**Fig III.2.1.** Imatges d'un nervi intacte (a), després d'una compressió (b), un autoempelt (c), una sutura epineurial (d), una sutura creuada (e), tubulització simple (f, f') i fascicular (g, g') amb silicona i amb una guia de PLC (h, h') immediatament després i als 90 dies de la reparació.



c) *Tubulització fascicular*: s'interposa una guia de silicona de doble llum entre els fascicles nerviosos resecats. Se suturen els extrems proximals de cada fascicle, tibial i peroneal, als corresponents de cada tub de la doble guia per mitjà d'un punt de sutura epineural-transmural amb fil de 10-0 i es repeteix la mateixa operació pels extrems distals. Es mesura el gap de 8 mm i s'omplenen els dos tubs de la guia amb sèrum fisiològic. El tub destinat al nervi tibial té un diàmetre intern de 2 mm mentre que el tub pel nervi peroneal és d'1 mm, i tots dos de 10 mm longitud i 0,5 i 0,25 mm de gruix respectivament.

## 2.2. Tractaments coadjuvants

Tots els animals han rebut un tractament d'amitriptilina (Sigma) per prevenir l'autotomia postlesió del nervi. L'amitriptilina s'ha administrat a la beguda a una concentració de 13,6 mg/100 ml, des de 14 dies previs a l'operació fins l'aparició de signes de reinnervació perifèrica. Aquesta pauta assegura un consum diari aproximat per animal de 8 mg/kg i evita l'autolesió (autotomia) secundària a la desaferentització completa de la pota de l'animal i el dolor neuropàtic induït per la lesió nerviosa (Navarro et al 1994a). Els animals que presentaven signes inicials d'autotomia (a nivell de les ungles) han estat aïllats de la resta en gàbies individuals i sotmesos a una dosi doble d'amitriptilina, de 27,2 mg/100ml. En pocs casos ha persistit aquest tipus de conducta i els animals afectats han estat retirats de l'experiment i sacrificats.

## 3. Grups experimentals

Aplicant els diferents tipus de lesions i reparacions del nervi ciàtic s'han definit nou grups experimentals. Han estat dividits en tres grans grups de comparació, segons la lesió generada hagi estat una compressió, una secció o una resecció del nervi ciàtic. A continuació s'especifiquen les abreviacions, el tipus de lesió i reparació emprada i el nombre d'animals de cada grup.

### a) Grup control

C (n=17): grup control d'animals sotmesos a una lesió fantasma (*sham lesion*) del nervi ciàtic.

### b) Grup sotmés a una compressió

X (n=9): compressió del nervi ciàtic sense cap mena de reparació.

### c) Grups sotmesos a una secció

SUT (n=11): secció i reparació per sutura epineural directa dels extrems seccionats.

SUTC (n=9): secció del nervi ciàtic i reparació per sutura creuada dels fascicles tibial i peroneal.

SIL4 (n=13): secció i reparació amb una guia de silicona, deixant entre els extrems del nervi un *gap* de 3-4 mm.

#### d) Grups sotmesos a una resecció

**INJ8** (n=9): resecció de 8 mm del nervi ciàtic reparada per autoinjert del mateix segment resecat.

**SIL8** (n=13): resecció i reparació amb una guia de silicona, deixant un *gap* de 8 mm.

**SIL8D** (n=9): resecció i reparació amb una doble guia de silicona de les branques tibial i peroneal de nervi ciàtic, deixant un *gap* de 8 mm pels dos fascicles.

**PLC8** (n=11): resecció i reparació amb una guia de PLC, deixant un *gap* de 8 mm.

## 4. Avaluació funcional de la regeneració nerviosa i la reinnervació

Els animals han estat avaluats preoperatòriament i postoperatòriament cada 30 dies durant tres mesos per tal de registrar l'evolució de la regeneració de fibres motores, sensorials gruixudes i primes i autonòmiques simpàtiques, així com la reinnervació de les seves estructures diana. Les tècniques utilitzades resulten innòquies per l'animal i només comporten la necessitat d'una anestèsia general lleu per limitar el possible sofriment. Per aquesta raó, és factible efectuar un seguiment seriati del procés en un mateix grup d'animals. Els valors de cada prova obtinguts abans de la intervenció han estat utilitzats com a controls dels resultats de regeneració i reinnervació en cada dia de seguiment. De manera paral·lela, s'ha efectuat un seguiment en tots els animals de la pota contralateral no operada les dades del qual no s'ha utilitzat en aquest estudi.

### 4.1. Reinnervació de fibres simpàtiques sudomotores (fibres C)

La regeneració de fibres simpàtiques sudomotores s'avalua per mitjà de la tècnica del motllo de silicona (Kennedy i Sakuta 1984). Els animals són sedats abans de la prova amb una anestèsia lleugera (15 mg/kg de pentobarbital i.p.). Després es procedeix a la injecció subcutània d'una solució a l'1% de nitrat de pilocarpina (Sigma), a una dosi de 10 mg/kg. La pilocarpina és un agonista colinèrgic, que estimula directament la secreció de les glàndules sudorípares (GS). Passats 30 minuts, s'extén un volum d'1 ml de barreja fluïda de monòmer de silicona (Elasticon, Kerr) amb 5 gotes d'accelerador depositades amb una xeringa amb agulla de calibre 23 G. A mesura que el material polimeritza i s'endureix sobre la superfície plantar de la pota, reté les impressions de les gotetes de suor que surten de cada GS. La quantitat i la localització de les impressions es determina sota microscopi per transil·luminació a 20 augments, comptant-ne el número en cada coixinet ( $\alpha$ ,  $\beta$ , A, B, C i D) i a les puntes dels cinc dits de la pota posterior de l'animal (1, 2, 3, 4, 5) (Fig III.3.1.)

Les GS dels mamífers són excepcions a l'anomenat principi d'hipersensibilitat a la denervació de Cannon (1939). Així, l'estimulació colinèrgica no promou la secreció de les GS de l'extremitat

posterior denervada de la rata. Amb l'inici de la reinnervació es comencen a registrar impressions a les àrees plantars més proximals de la pota posterior, incrementant-se l'extensió de les regions amb sudoració reactiva a mesura que es completa la reinnervació distal. El recompte del nombre d'impressions de suor recollides pel motllo és un indicador del grau de reinnervació sudomotora per axons simpàtics postganglionars (Kennedy i Navarro 1993).

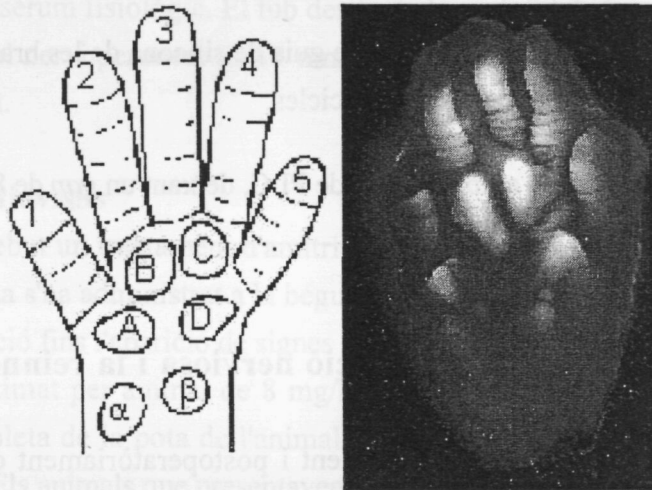


Fig III.3.1. Esquema de les àrees de sudoració a la planta de la pota i les puntes dels dits de la rata. Fotografia d'un motllo de silicona.

#### 4.2. Reinnervació de fibres sensorials primes (fibres nociceptives A $\delta$ i C)

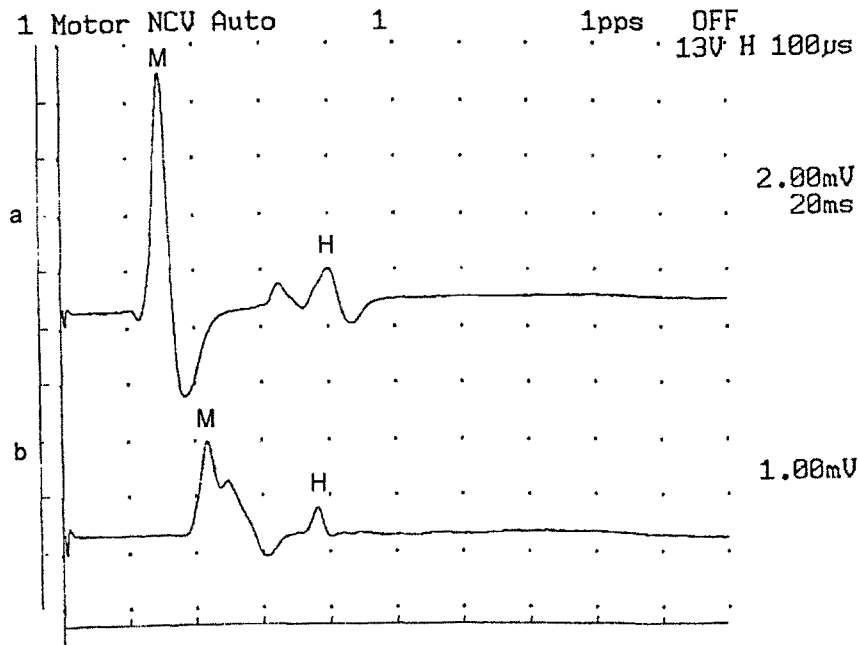
La regeneració i reinnervació d'axons nociceptius han estat avaluades per mitjà d'una prova d'algesimetria plantar per estimulació tèrmica (Hargreaves et al 1988, Galbraith et al 1993). Els animals han estat situats en uns contenidors de metacrilat suportats per una superfície elevada de vidre de 7 mm de gruix mantingut a una temperatura constant de  $30 \pm 0,5^\circ\text{C}$ . Mitjançant una bombeta incandescent de 150 W que emet un feix de llum circular de 5 mm de diàmetre, s'ha escalfat la superfície del vidre per sota de la planta de la pota posterior de l'animal. L'escalfament progressiu del vidre es transmet a la pell de la rata que fa una resposta reflexa de retirada al dolor per calor. Amb un cronòmetre connectat a un sensor infraroig es determina el temps transcorregut de l'inici de l'escalfament fins la resposta de retirada. La prova s'efectua per triplicat, amb tres assajos separats al menys 15 minuts, considerant com a temps de latència de la prova la mitjana dels tres valors. Per tal d'evitar efectes lesius del calor sobre la pell, especialment en fases d'anestèsia, es limita el temps d'exposició a la font de calor a un màxim de 30 segons. Aquesta prova s'ha realitzat bilateralment i el temps de latència fins a la retirada de la pota operada s'ha expressat com a percentatge del temps corresponent a la pota sana contralateral. D'aquesta manera es normalitzen els resultats malgrat que les condicions d'escalfament del vidre segons la temperatura ambient puguin canviar. De manera periòdica, s'obté una corba d'escalfament del vidre en funció dels temps que permet conèixer la intensitat de l'estímul tèrmic segons el temps transcorregut. La denervació de l'extremitat posterior elimina la sensibilitat termoalgèsica i anul·la la resposta de retirada, de manera que, quan comença la reinnervació, reapareix la resposta de retirada i a mesura que augmenta la densitat de la reinnervació es va reduint el temps de latència.

### 4.3. Reinnervació de fibres motores (fibres A $\alpha$ )

El grau de reinnervació muscular ha estat avaluat mitjançant l'estimulació elèctrica transcutània del nervi ciàtic proximal a la lesió, amb agulles de 23G, i el registre del potencial d'acció muscular compost (PAMC), amb un sistema d'elèctrodes monopolars d'agulla de 28G (Nicolet) insertats a la superfície dels músculs plantars, gastrocnemi i tibial anterior, utilitzant un electromiògraf Sapphyre 4M (Medelec/Vickers) (Navarro et al 1994b). L'animal ha estat anestesiàt amb una dosi de 30 mg/kg de pentobarbital sòdic i fixat sobre d'una placa de coure en posició de decúbit supí, amb les potes posteriors i els dits en extensió per sobre d'una banda adherent. En totes les proves de conducció nerviosa, sensibles als canvis de temperatura, l'animal ha estat mantingut a una temperatura cutània mesurada a la pell de la pota posterior d'entre 32 i 34°C per mitjà d'un serpentí pla termostatat. El sistema de registre consta d'un elèctrode de terra (G) situat a la base del 1<sup>r</sup> dit, d'un elèctrode de referència (G2) situat a la porció lateral de la punta del 4<sup>t</sup> dit de la pota i un elèctrode actiu o de registre (G1) insertat segons el múscul testat en alguna de les següents localitzacions: *múscul plantar*: al centre de la planta entre els coixinets A i D; *múscul gastrocnemi*: sobre el cos medial del gastrocnemi a nivell del seu terç mig; *múscul tibial anterior*: entre el terç mig i el terç superior de la massa muscular situada per davant de la tibia. El nervi ciàtic ha estat estimulat per mitjà d'un càtode col·locat a la fenedura ciàtica i un ànode insertat subcutàniament i separat 1 cm en direcció proximal, aplicant estímuls elèctrics rectangulars de 100  $\mu$ s de durada, d'intensitat creixent fins a nivell supramàxim (25% per sobre de la intensitat que produeix un PAMC de màxima amplitud). Els filtres mínim i màxim s'han situat entre 1 Hz i 5 KHz. Sobre el registre en pantalla s'ha determinat els temps de latència en mil·lisegons (ms) des de l'artefacte d'estimulació fins a l'inici de la deflexió negativa del PAMC i l'amplitud màxima d'aquest en mV des del primer punt d'inflexió fins al pic negatiu màxim del potencial (ona M). Els registres dels PAMC han estat adquirits abans de l'operació a una escala d'entre 1 i 5 mV per divisió pel múscul plantar i entre 5 i 10 mV per divisió pels músculs gastrocnemi i tibial anterior. Durant el període de reinnervació s'han utilitzat una escala d'entre 100 i 500  $\mu$ V per divisió pel plantar i d'entre 1 i 5 mV per divisió per la resta de músculs (Fig. III.4.1).

L'amplitud del PAMC és un índex de la massa muscular innervada i, per tant, indirectament del nombre d'axons  $\alpha$ -motors que innerven el múscul, mentre que el temps de latència reflecteix la velocitat dels axons més ràpids que reinnerven el múscul i el seu grau de mielinització. El registre electromiogràfic dels tres músculs esmentats permet valorar la reinnervació de dianes localitzades en una regió proximal (músculs gastrocnemi i tibial anterior) o distal (múscul plantar) del punt de lesió. A més els PAMCs dels músculs plantar i gastrocnemi avaluen la regeneració pel fascicle tibial del nervi ciàtic, mentre que el del tibial anterior representa la regeneració a través del fascicle peroneal. Dies després de la lesió i quan el segment distal ja ha perdut la seva excitabilitat, no es registra cap PAMC evocat per estimulació elèctrica del nervi ciàtic. Al cap d'una setmana poden registrar-se potencials de fibril·lació producte de la despolarització espontània de fibres musculars, indicatius de denervació muscular. A mesura que comença la reinnervació es poden registrar PAMC de llarga

latència, baixa amplitud i ampla durada i dispersió en el temps causada per la gran varietat en la velocitat de conducció dels axons regenerats. A mesura que es completa la reinnervació distal, el PAMC es compacta, s'incrementa la seva amplitud i disminueix el seu temps de latència i la seva durada.



**Fig. III.4.1.** Registre del potencial d'acció muscular compost del múscul plantar d'un animal control (a) i d'una animal sotmès a una secció del nervi ciàtic reparada per sutura i deixada regenerar durant 90 dies (b). L'alçada de l'ona M és indicativa del nombre d'axons motors que reinnerven el múscul. temps transcorregut fins a l'inici de de l'ona indica el grau de mielinització axonal i la velocitat de conducció. L'ona H és una resposta muscular reflexa monosinàptica mediada per fibres sensorials procedents dels fusos musculars (fibres Ia).

#### 4.4. Reinnervació de fibres sensorials gruixudes (fibres A $\beta$ )

La regeneració d'axons sensorials gruixuts ha estat quantificada per estudis neurogràfics, amb estimulació elèctrica del nervi ciàtic a nivell de la fenedura ciàtica i registre del potencial d'acció nerviós compost (PANC) del nervi tibial i dels nervis digitals del 2<sup>n</sup>, 4<sup>t</sup> i 5<sup>é</sup> dit de la pota operada (Navarro et al 1994b). L'estimulació del nervi i el registre dels potencials ha estat realitzat amb el mateix electromiògraf, Sapphyre 4M, i electrodes que en els registres motors. Els electrodes de registre pels *nervis digitals* s'han col.locat, el de referència (G2) a la cara lateral de la punta i l'actiu (G1) al lateral de la base de cada dit avaluat. Per obtenir el PANC del *nervi tibial* s'ha insertat l'elèctrode actiu subcutàniament a la cara interna del turmell. Els estímuls elèctrics han estat de 100  $\mu$ s de durada i d'intensitat supramàxima. Els filtres mínim i màxim s'han situat entre 3Hz i 2 KHz. Sobre els registres s'han determinat els temps de latència des de l'artefacte d'estimulació fins a l'inici de la primera deflexió negativa del PANC en ms i l'amplitud de l'ona negativa màxima en  $\mu$ V. L'escala d'adquisició dels PANC s'ha situat entre 10 i 20  $\mu$ V per divisió pels nervis digitals i d'entre 50 i

100 $\mu$ V per divisió pel nervi tibial abans de l'operació, mentre que durant la reinnervació s'ha situat entre 2 i 5 $\mu$ V pels primers i entre 20 i 100 $\mu$ V pel segon.

L'amplitud del PANC és un indicador del nombre d'axons, fonamentalment sensorials tipus A $\beta$  que arriben als dits en els registres digitals i una mescla d'axons A $\alpha$  i A $\beta$  en el registre del nervi tibial al taló (nervi mixt). El registre de l'activitat elèctrica del nervi tibial a nivell del taló i dels nervis digitals permet avaluar la regeneració sensorial proximal i distal, respecte del punt de lesió. Després de la lesió desapareixen els PANCs que tenen tendència a recuperar la seva amplitud, latència i duració habituals a mesura que té lloc la regeneració nerviosa. El temps de latència és indicatiu del grau de mielinització i la velocitat de conducció assolits després de la lesió (Fig III.4.2).

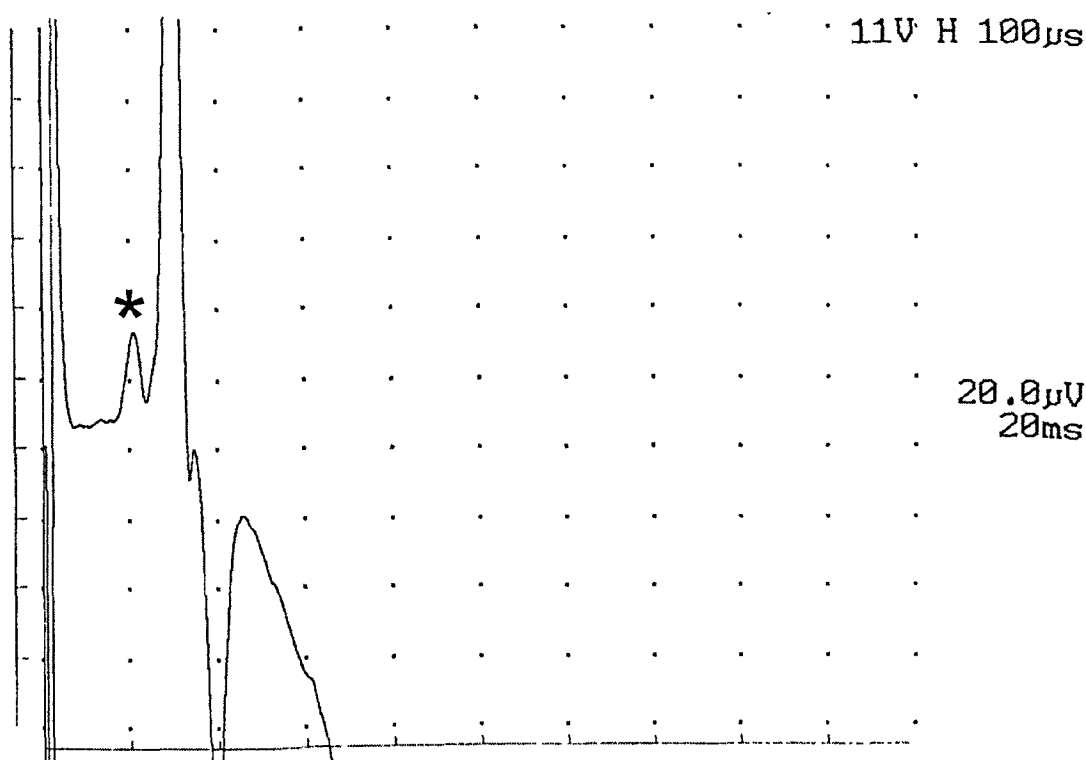


Fig III.4.2. Registre del potencial d'acció nerviós compost del nervi digital (\*) d'un animal control

## 5. Recuperació de la funció locomotora global

L'avaluació de la capacitat global de deambulació ha estat duta a terme per mitjà de la prova del *walking track* (De Medinaceli et al 1982). Amb pintura vermella es pinzella la superfície plantar de les dues potes posteriors de la rata i, a continuació, se la deixa anar a l'entrada d'un passadís de 40 cm de longitud, 8 cm d'amplada i 10 cm d'alçada i que desemboca en una obertura d'entrada a un compartiment tancat i fosc. A mesura que l'animal camina buscant la foscor, va deixant marcades en



vermell les seves petjades sobre un paper blanc que es col·loca formant el sòl del passadís. Cal assegurar que l'animal manté una velocitat de marxa uniforme enllarg de tot el trajecte. S'han d'eliminar per tant els registres obtinguts amb un excés de velocitat de la deambulació en els quals només apareixen les empremtes més distals de la pota, o aquells en els quals la rata enlenteix o atura el seu desplaçament. Abans d'efectuar el registre definitiu s'entrena l'animal a efectuar el recorregut tres vegades seguides per tal de familiaritzar-lo amb la tasca a accomplir. Entre tots els registres realitzats s'escull una petjada representativa de la pota operada i la seva corresponent contralateral (Fig. III.5.1). Amb un peu de rei es mesuren en mil·límetres sobre cada empremta els següents paràmetres: la distància màxima longitudinal de la petjada (*PL*, *Print Length*), la distància màxima transversal entre les marques del 1<sup>r</sup> i el 5<sup>è</sup> dit (*TS*, *Toe Spreading*) i la distància entre les empremtes del 2<sup>n</sup> i el 4<sup>t</sup> dit (*IT*, *Intermediary Toes*). Amb aquests tres paràmetres es construeix un índex de la recuperació locomotora de l'extremitat operada respecte de la control contralateral per cada dia de seguiment (De Medinaceli et al 1982, Bain et al 1989):

$$\text{Index Funcional del Ciàtic} = -38,3 \frac{\text{EPL-NPL}}{\text{NPL}} + 109,5 \frac{\text{ETS-NTS}}{\text{NTS}} + 13,3 \frac{\text{EIT-NIT}}{\text{NIT}} - 8,8$$

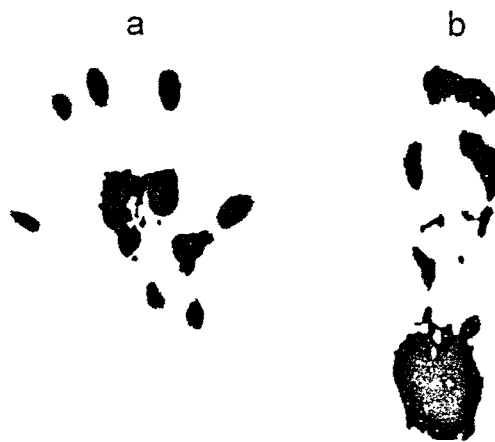


Fig. III.5.1. Registre de les petjades d'un animal control (a) i un animal amb secció reparada del ciàtic (b) 90 dies després de la lesió. La lesió denerva la musculatura flexora i extensora de l'extremitat posterior i dels dits del peu, poduint un increment de la distància longitudinal total (PL), i una reducció de la distància transversal entre el 1<sup>r</sup>-5<sup>è</sup> dits (TS) i el 2<sup>n</sup>-4<sup>t</sup> dits (IT)

El *walking track* és una prova que avalua globalment la conducta motriu desenvolupada per l'animal abans i després de la lesió i indica la recuperació de la funció en la qual el nervi lesionat està directament implicat. La secció del nervi ciàtic desaferentitza els *inputs* mecanosensorials i propioceptius procedents de la planta i l'extremitat posterior de l'animal i desactiva la musculatura extensora del peu i els dits innervada per la branca peroneal i la flexora innervada per nervi tibial. En aquestes condicions l'animal perd la capacitat de separació dels dits de la pota, reduint-se les

distàncies TS i IT (branca peroneal), i de caminar recolzant les parts més distals dels dits, fet que incrementa el segment PL (branca tibial). Aquests paràmetres haurien de recuperar-se fins a valors preoperatoris a mesura que es produeix la reinnervació muscular i sensorial perifèrica.

## **6. Avaluació electrofisiològica de l'especificitat de la reinnervació perifèrica**

Al final del període de seguiment els animals de cada grup experimental s'han anestesiats, per tal de dissecar el nervi ciàtic regenerat al llarg del seu trajecte des de la fenestra ciàtica fins a nivell de la fossa poplíteia. Una vegada alliberat el tronc nerviós, s'ha dut a terme la dissecció fascicular de les branques tibial, peroneal i també sural, quan ha estat possible, per damunt del punt de lesió i s'han seccionat a nivell proximal, deixant uns quants mil·límetres de cada fascicle fins al punt de lesió. El tronc del nervi ciàtic en primera instància i, després de la dissecció, cadascun dels fascicles han estat succionats dins d'una càndula de vidre de diàmetre adaptat a la seva gruixària, plena de solució salina i connectada a un elèctrode de succió muntat sobre un micromanipulador. L'elèctrode es troba connectat a través d'un tub de silicona i una clau de tres passos a una xeringa plena de solució salina. Estirant de l'èmbol de la xeringa es crea una pressió negativa que aspira l'extrem del nervi dins de la pipeta de vidre. El contacte del nervi amb les parets de la càndula segella el sistema i impedeix les pèrdues. Cada fascicle ha estat estimulat, emprant l'elèctrode de succió com a càtode, mentre que l'anòde, consistent en una agulla, s'ha insertat a nivell subcutani proximalment. D'aquesta manera, a la vegada que es focalitza l'estimulació, s'efectua l'estimulació directa dels nervis i s'eviten els efectes nocius de l'estimulació perllongada amb elèctrodes metàl·lics. El camp obert ha estat mantingut amb oli de parafina per prevenir la conducció per massa de l'estímul aplicat i afavorir la conservació dels fascicles. Durant tota la prova, l'animal s'ha mantingut sota anestèsia profunda i a una temperatura controlada (32 a 34°C de temperatura cutània perifèrica).

Amb aquesta disposició, en un grup d'animals controls s'han definit els territoris musculars, sensorials i sudomotors normals de cada fascicle del ciàtic i la resposta quantitativa corresponent. L'obtenció de modificacions d'aquests patrons d'innervació després de diferents tipus de lesions i reparacions del nervi ciàtic, serà indicativa d'errors en la reinnervació perifèrica.

### **6.1. Especificitat de la reinnervació muscular (fibres motores A $\alpha$ )**

Estimulant separatament el tronc ciàtic i els seus fascicles tibial, peroneal i sural, s'han registrat, per mitjà de microelèctrodes monopolars d'agulla intramusculars, tal i com ha estat ja descrit per a l'avaluació de la reinnervació muscular, els PAMC detectables als músculs plantar, gastrocnemi i tibial anterior. Els PAMC han estat obtinguts amb pulsos elèctrics simples rectangulars de 100  $\mu$ s de durada i d'intensitat supramàxima. S'ha registrat activitat durant els 20 ms posteriors a l'estimulació. Sobre els registres s'ha determinat els temps de latència fins a la deflexió negativa de l'ona M i l'amplitud màxima d'aquesta.

## 6.2. Especificitat en la reinnervació sensorial (fibres sensorials A $\beta$ )

Per determinar l'especificitat de la reinnervació d'axons sensorials s'ha estimulat el tronc del nervi ciàtic i les seves branques tibial, peroneal i sural, registrant els PANC a nivell dels nervis digitals del 2n, 4t i 5è dits i del nervi tibial al turmell per mitjà d'elèctrodes monopolars insertats subcutàniament a prop dels nervis. Els PANC han estat obtinguts amb pulsos elèctrics de 100  $\mu$ s de durada i d'intensitat supramàxima. Sobre els registres s'ha determinat els temps de latència fins a l'inici de l'ona de despolarització nerviosa i l'amplitud màxima d'aquesta.

## 6.3. Especificitat de reinnervació sudomotora (fibres simpàtiques C)

Per avaluar l'especificitat dels territoris de reinnervació de les GS per fibres simpàtiques s'ha estimulat el nervi ciàtic i successivament cadascuna de les seves branques amb l'elèctrode de succió, aplicant una estimulació repetida a una freqüència de 15 Hz, d'estímuls d'intensitat supramàxima pel llindar motor, de 200  $\mu$ s de duració durant 5 minuts (estimulador S44, Grass Instruments). L'activitat sudomotora induïda per l'estimulació elèctrica ha estat registrada efectuant motllos de silicona de la superfície plantar de la pota estimulada als 3 i 5 minuts de l'inici de l'estimulació (Navarro i Kennedy 1990a). Sota lupa binocular s'han comptat en cada motllo les impressions de suor dels coixinets plantars ( $\alpha$ ,  $\beta$ , A, B, C i D) i de les puntes dels cinc dits (1, 2, 3, 4, 5).

## 7. Avaluació morfològica de l'especificitat de la reinnervació perifèrica

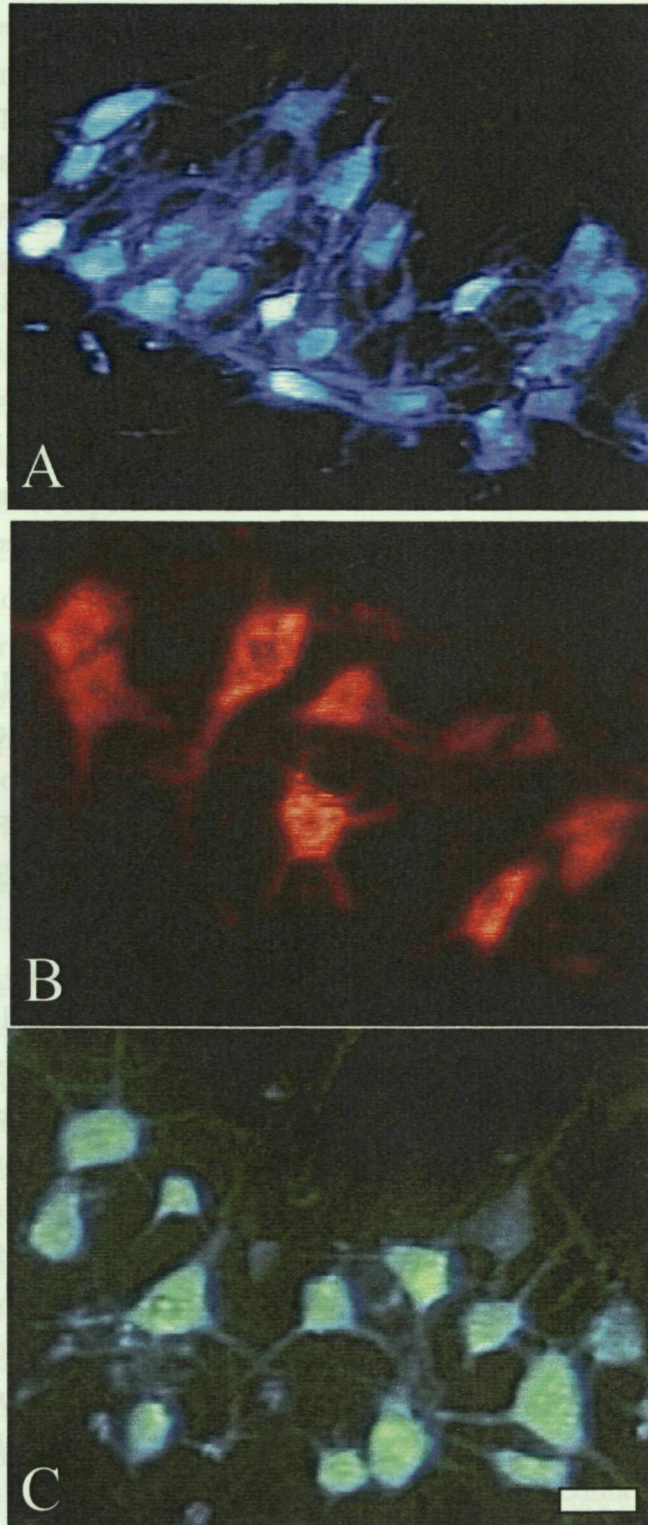
Per avaluar histològicament l'especificitat de la reinnervació i la capacitat de col·lateralització dels axons regeneratius, s'han operat una sèrie de grups experimentals complementaris amb lesions anàlogues a les de quasi tots els grups estudiats funcionalment (C, X, SUT, SIL4, SUTC, INJ8, SIL8 i PLC8), de 6 animals per grup. Tres mesos després de l'operació, i després de quantificar electrofisiològicament els nivells de reinnervació muscular assolits, s'ha dissecat el nervi ciàtic, separant distalment al punt de lesió les branques peroneal i tibial. A continuació s'han seccionat en el punt més distal possible abans de penetrar en la massa muscular corresponent el nervi peroneal, la branca del nervi tibial que dona innervació al cos medial del múscul gastrocnemi i el tronc del nervi tibial a nivell del taló just abans de dividir-se en les seves dues branques plantars. L'extrem proximal de secció de cadascun d'aquests fascicles ha estat exposada durant 20 minuts a una quantitat suficient de cristalls de traçadors fluorescents que en ser excitats emeten llum fluorescent de diferents longituds d'ona. Així el nervi peroneal que projecta sobre el múscul tibial anterior ha estat marcat amb DiI que emet llum de color vermella (Molecular Probes), el nervi del gastrocnemi medial amb Fast Blue de color blau elèctric (EMS-Plyol GmbH, GroßUmstadt) i el nervi tibial-plantar amb FluoroGold que emet llum de tonalitat daurada-grisos (Fluorochrome Inc, Englewood) (Angelov et al 1999). L'aplicació de traçadors fluorescents s'ha realitzat amb la màxima cura per tal d'evitar la seva difusió sanguínia o el marcatge per contigüïtat de fascicles nerviosos adjacents. Finalitzada l'exposició, s'ha netejat amb solució salina la zona i s'ha resuturat la musculatura i el pla cutani de la cuixa. Les extremitats posteriors esquerres, no operades, dels grups experimentals i controls han

estat aprofitades per marcar una d'altres branques del nervi ciàtic que innerven el múscul solí, els músculs flexors dels dits, així com el nervi sural i el nervi safè.

Deu dies després de l'aplicació dels traçadors fluorescents, temps necessari per assegurar el seu transport retrògrad fins als soma de les motoneurons i neurones sensorials, s'ha procedit a la perfusió-fixació. Després d'anestesià profundament els animals amb èter, s'han perfós per via intracardiàcia, inicialment durant 60 segons amb tampó PBS (0,1M, pH 7,38) i posteriorment durant 20 minuts amb una solució de paraformaldehid al 4% en PBS (0,2M, pH 7,38). Seguidament s'ha procedit a l'extracció de la medulla espinal i s'ha separat amb un bisturí un segment de 2,5 cm des de l'extrem distal del conus espinal, que conté els segments lumbar i sacres d'interès. S'ha realitzat una postfixació de 24 hores a 4°C en paraformaldehid al 4% amb agitació constant. La mostra medullar ha estat tallada en seccions longitudinals de 50 µm de gruix en direcció ventral-dorsal amb un vibràtom (FTB-vibracut, Plano, Marburg) i muntades en grups de tres en portaobjectes de vidre de manera seriada i conservant-ne l'ordre original.

Les seccions han estat excitades i observades a través de dos jocs de filtres (Carl Zeiss) diferents: un per visualitzar conjuntament el Fast Blue i el Fluoro Gold (Filter Set 01: excitació BP 365/12 i emissió LP 397) diferenciables clarament pel color de la llum emesa, i l'altre per visualitzar el DiI (Filter Set 15: excitació BP 546/12 i emissió LP 590) (Angelov et al 1999) (Fig III.7.1). No s'ha demostrat l'existència de fluorescència creuada entre els filtres per a DiI i per FB-FG (Angelov et al 1999). Imatges de cadascuna de les seccions amb presència de cèl·lules marcades han estat adquirides amb cadascun d'aquests filtres, per mitjà d'una càmera de vídeo CCD (Optronics Engineering Model DEI-470) i emmagatzemades en un ordinador en format TIFF. Amb l'ajut del programa d'anàlisi d'imatges Optimas 6.1 (Optimas Corporation, Bothell) i aplicant el mètode de fraccionament (Gundersen 1986) s'ha comptabilitzat les motoneurons amb nucli visible en una de cada tres seccions espinals correlatives de 50µm de gruix i s'han multiplicat per tres els comptatges finals. Per més seguretat, s'ha quantificat un grup de 6 animals control comptant cadascuna de les seccions i s'ha comparat amb el mètode estimat sense trobar diferències significatives. De fet tenint en compte que el diàmetre de les motoneurons, segons alguns treballs i observacions pròpies (Streppel et al 1998), se situa a l'entorn entre 30-40µm i rarament supera els 50µm, es pot estar segur de no comptar en seccions d'aquesta gruixària dues vegades la mateixa cèl·lula (Swett et al 1986). El nombre de motoneurons amb marcatges dobles de Fast Blue i Fluoro Gold ha estat determinat visualment per la presència d'ambdós traçadors al soma neuronal que adopta una coloració gris-perlada. El nombre de dobles marcatges amb Fast Blue i DiI o Fluoro Gold i DiI o de neurones amb triple marcatge ha estat determinat mitjançant la superposició d'una màscara binaritzada, mostrant els perfils cel·lulars, de la imatge obtinguda amb el dos jocs de filtres. En les mateixes imatges, amb l'ajuda del programa NIH-Image, s'han determinat també les mides, la posició relativa i la densitat cel·lular dels nuclis motors dels músculs estudiats.





**Fig III.7.1.** Imatges de fluorescència de motoneurons d'animals control. Fluorescència per a Fast Blue (A), Dil (B) i Fluoro Gold (C). Barra = 50µm.

## 8. Avaluació funcional de les respostes reflexes espinals

L'estudi dels canvis en l'activitat de reflexos espinals després dels diferents tipus de lesions i reparacions del nervi ciàtic s'ha efectuat també de manera mensual durant tres mesos en els diferents grups experimentals. S'han registrat respostes reflexes monosinàptiques (ona H) i respostes reflexes polisínàptiques de retirada ipsilaterals (reflex flexor) i contralaterals (reflex extensor creuat). En tots aquests registres s'ha mantingut l'animal sota anestèsia profunda amb una dosi de 40 mg/kg de pentobarbital sòdic i.p., amb temperatura controlada i fixat sobre d'una placa de coure en posició de decúbit supí. Per mantenir un estat anestèsic constant s'han administrat cada 60 minuts dosis addicionals de 10 mg/kg de pentobarbital. L'estimulació i el registre de l'activitat reflexa s'ha realitzat per mitjà d'un electromiògraf Sapphyre 4M (Medelec/Vickers).

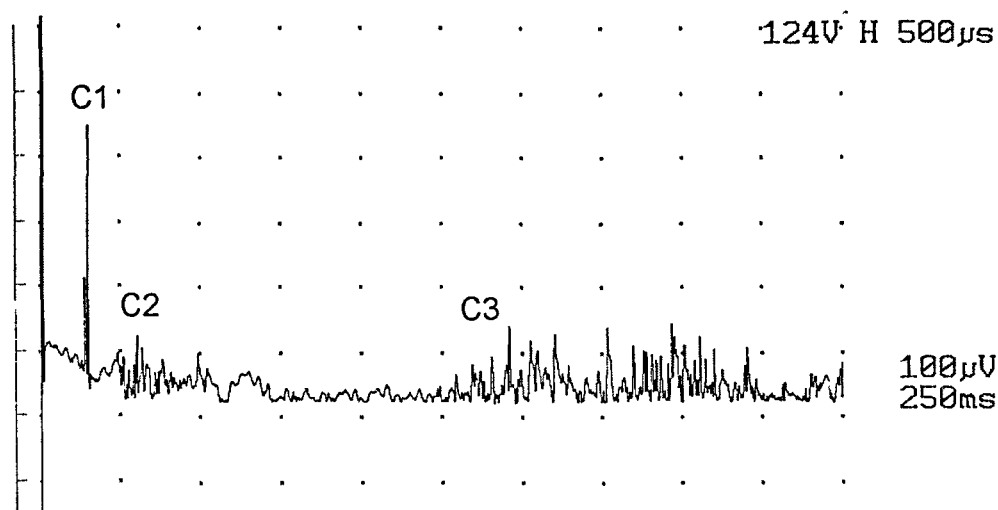
### 8.1. Resposta reflexa monosinàptica: ona H

L'estimulació elèctrica d'un nervi perifèric evoca una resposta directa anterògrada conduïda per axons motors que finalitza amb la despolarització muscular (ona M). Al mateix temps, l'estímul produeix la despolarització d'axons sensorials tipus Ia que formen part de l'arc del reflex miotàtic. Aquestes fibres sensorials condueixen l'estímul fins a la medul·la on sinapten amb un grup reduït de motoneurons. Com a producte de l'excitació postsinàptica les motoneurons es despolaritzen conduint distalment cap al múscul nous potencials d'acció que evocaran una resposta de despolarització muscular reflexa tardana (ona H). Estimulant el nervi ciàtic i registrant respostes musculars de la manera ja explicada, s'han registrat les respostes reflexes dels músculs plantar, gastrocnemi i tibial anterior (Navarro et al 1994b). S'han aplicat estímuls únics de 100  $\mu$ s de durada i supramàxims per l'ona H. L'escala d'adquisició preoperatòria s'ha situat entre 0,5 i 1 mV per divisió pel múscul plantar i entre 1 i 5 mV/divisió pel gastrocnemi i el tibial anterior. En músculs reinnervats l'escala d'adquisició s'ha situat entre 100 i 500  $\mu$ V pel plantar i entre 0,5 i 1 mV pel gastrocnemi i tibial anterior. El temps de registre ha estat de 20 ms. S'ha quantificat la latència fins a l'inici de l'ona H en ms i la seva amplitud en mV (Navarro et al 1999) (Fig. III.4.1).

### 8.2. Reflexos nociceptius de retirada: flexor ipsilateral i extensor contralateral

L'estimulació elèctrica de fibres sensorials nociceptives del nervi tibial produeix una resposta reflexa d'activació de la musculatura flexora ipsilateral, entre ells els músculs semitendinos i bíceps femoris, destinada a retirar l'extremitat posterior afectada de la font aversiva. El circuit reflex consisteix en fibres aferents de diverses classes, connexions medul·lars polisínàptiques fins a les motoneurons apropiades. En les condicions d'anestèsia i posició esmentades, s'ha estimulat el nervi tibial per mitjà d'un càtode a la cara medial del turmell i un ànode distal al marge medial de la pota. La resposta muscular s'ha registrat en el múscul bíceps femoris per mitjà d'un elèctrode de registre localitzat en la profunditat del múscul, un elèctrode de referència subcutani a nivell del trocànter i un elèctrode de terra a l'arrel de la cua. S'han aplicat estímuls elèctrics únics rectangulars de 500  $\mu$ s de durada i intensitat supramàxima pels components de la resposta reflexa. Els filtres mínim i màxim s'han situat

a 3Hz i 5KHz. L'escala d'adquisició s'ha situat entre 200 i 500  $\mu\text{V}$  en fases preoperatòries i entre 50 i 100 $\mu\text{V}$  en les de reinnervació. Sobre el registre obtingut durant 250 ms i rectificat, s'han mesurat els temps de latència, el nombre de pics i l'amplitud màxima de cada component: C1 (mediat per fibres  $A\beta$ ), C2 (mediat per fibres  $A\delta$ ) i en alguns grups C3 (mediat per fibres C) (Fig III.8.1).



**Fig III.8.1.** Registre del reflex de retirada extensor creuat del múscul tibial esquerre obtingut per estimulació del nervi tibial dret en un animal control, amb els seus tres components d'activitat: C1 ( $A\beta$ ), C2 ( fibres  $A\delta$ ) i C3 (fibres C).

La mateixa estimulació elèctrica de fibres aferents del nervi tibial produeix també una resposta reflexa d'activació de la musculatura flexora i extensora contralateral. El circuit reflex que la condueix és de tipus polisínàptic i creua la línia mitjana fins a projectar-se mitjançant interneurons sobre les motoneurons de l'hemimedulla contralateral. Seguint el procediment descrit, s'ha estimulat el nervi tibial, registrant ara l'activitat muscular reflexa evocada sobre els músculs gastrocnemi i tibial anterior contralaterals. Sobre el registre rectificat, s'han mesurat els temps de latència, el nombre de pics i l'amplitud màxima dels tres components d'activitat: C1 (mediat per fibres  $A\beta$ ), C2 (mediat per fibres  $A\delta$ ) i C3 (mediat per fibres C) (Navarro et al 1999)

### 8.3. Avaluació dels llindars d'excitabilitat de les respostes reflexes

Per a tipificar els llindars d'estimulació de l'ona H respecte a l'ona M i el tipus de fibres aferents que condueix aferentment l'estímul dels components C1, C2 i C3 dels reflexos s'ha avaluat en un grup de 36 i 24 animals controls el llindar d'intensitat mínim i màxim de la resposta de despolarització muscular directa (ona M) i reflexes monosínàptiques (ona H) i el llindar mínim dels tres components de respostes polisínàptiques.

Per valorar l'excitabilitat del reflex monosínàptic, s'ha estimulat el nervi ciàtic amb pulsos elèctrics de 100  $\mu\text{s}$  de durada i intensitats des de 0,0 mA fins a un màxim de 35,0 mA en increments de 0,1 mA. S'ha determinat el llindar mínim del reflex, el llindar de màxima resposta i s'ha registrat algunes corbes de reclutament de l'ona H del múscul plantar segons intensitat d'estimulació de l'ona H i de



l'ona M. De manera similar, l'excitabilitat dels diferents components dels reflexes polisinàptics ipsi i contralaterals s'ha estimat estimulant el nervi tibial a nivell del taló amb pulsos de a estímuls de 50, 100, 200 i 500 $\mu$ s de durada i intensitats creixents de 0,0 mA fins a 75,0 mA en increments de 0,1 mA. S'ha determinat el llindar mínim d'excitabilitat dels components C1, C2 i C3.

## 9. Protocol de seguiment

Una vegada realitzades les lesions nervioses amb les seves corresponents reparacions s'ha avaluat mensualment durant 3 mesos la regeneració i reinnervació de fibres motores, sensorials gruixudes, sensorials primes i sudomotores, l'activitat reflexa monosinàptica i polisinàptica i la deambulació global. Com a proves finals els animals de cada grup han estat subjectes a l'estudi funcional de l'especificitat de reinnervació i d'altres a l'estudi histològic amb retrotraçadors del mateix fenomen. En alguns grups d'interés alguns exemplars han estat seguits fins a 6 mesos després de l'operació. Aquesta informació ha permès comprovar que als 3 mesos de la lesió tots els grups de lesió arriben a un nivell gairebé màxim de recuperació dels diferents paràmetres funcionals, que no es modifica substancialment en mesos següents. Per aquesta raó aquestes dades no seran mostrades en aquesta memòria.

### *Avaluació funcional de la regeneració, la reinnervació i la recuperació*

Per tal d'evitar que l'aplicació d'una tècnica pogués alterar els resultats de la següent, s'ha mantingut un ordre fix de prelació de les diferents proves de regeneració i reinnervació funcional:

- 1) Regeneració i reinnervació de fibres simpàtiques: motllo de silicona
- 2) Regeneració de fibres sensorials primes: algesimetria
- 3) Regeneració i reinnervació de fibres motores: registre de PAMCs i de l'ona H de músculs plantar, gastrocnemi i tibial anterior ipsilaterals i contralaterals
- 4) Regeneració i reinnervació de fibres sensorials gruixudes: registre de PANCs de nervis digitals i tibial ipsilaterals i contralaterals
- 5) Reflexes nociceptius de retirada: registre del reflex flexor ipsilateral del múscul bíceps femoris i dels reflexes extensors contralaterals dels músculs gastrocnemi, tibial anterior i plantar.
- 6) Recuperació del patró de locomoció: prova del *walking track*.

### *Avaluació electrofisiològica de l'especificitat de la reinnervació perifèrica*

Una vegada acomplerts els tres mesos de seguiment i després d'efectuar l'avaluació final de la recuperació de les diferents proves funcional s'ha dissecat la cara posterior de la cuixa i s'ha procedit a l'estimulació fascicular del nervi ciàtic i les seves diferents branques seguint el procediment exposat a l'apartat III.5:



- 1) Especificitat de reinnervació de fibres motores: músculs plantars, gastrocnemi i tibial anterior.
- 2) Especificitat de reinnervació de fibres sensorials gruixudes: nervis digitals i tibial.
- 3) Especificitat de reinnervació de fibres autonòmiques sudomotores.

#### *Avaluació morfològica de l'especificitat de la reinnervació*

Per a l'avaluació histològica de l'especificitat de la reinnervació s'han repetit grups sotmesos a lesions anàlogues a les ja realitzades. S'han deixat regenerar durant 90 dies. Al final del seguiment s'ha avaluat, per mitjà dels retrotraçadors Fluoro Gold (FG), Fast Blue (FB) i DiI:

## **10. Anàlisi de les dades**

Per a l'anàlisi de les dades s'ha utilitzat un equip microinformàtic Macintosh (models IIFfx i Power PC) i diversos programes per aquest sistema operatiu. Els resultats obtinguts de cada prova han estat anotades per a cada animal i dia de seguiment en els seus fulls de seguiment corresponents. Posteriorment, s'ha transferit les dades a un full de càlcul (Microsoft Excel 5.0) i s'han calculat les mitjanes grupals i els errors estàndars dels valors de cada prova. S'han representat gràficament els valors mitjans de cada grup emprant un programa de representació gràfica (Cricket Graph 3.0). Les dades obtingudes de cada animal s'han transferit a un full estadístic (StatView 4.5) per realitzar l'estadística descriptiva i inferencial dels diferents grups. Donada la població de subjectes experimentals, s'han utilitzat com a proves estadístiques, proves no paràmetriques tant per a les comparacions intergrupals (Kruskall-Wallis i U de Mann-Withney) com per a les comparacions intragrups de dades aparellades (Rang de Wilcoxon). Per a la comparació de les proporcions d'animals amb recuperació s'ha aplicat el test de la  $X^2$  (Chi square). En tots els casos, s'ha considerat com a significatiu un valor de  $p < 0,05$ .

#### *Avaluació funcional*

Els valors preoperatoris de les diferents proves d'avaluació de la innervació muscular, sensorial i sudomotora, de les respostes reflexes i de l'activitat de deambulació s'han considerat com a valors controls i corresponents al 100% d'activitat funcional per a cada animal. Els valors obtinguts en el seguiment postoperatori s'han expressat com a percentatge del valor control en cada dia d'avaluació. Els valors absoluts dels temps de latència desapareixen amb la denervació i recuperen valors més llargs als preoperatoris amb la reinnervació, per aquesta raó els valors evolucionen des de valors superiors fins al 100%. Els valors de l'algesimetria s'han expressat com el percentatge de la latència de retirada de la pota operada respecte de la pota sana, i s'han indicat com a valors superiors que tendeixen al 100% amb la regeneració. En la resta de proves funcionals, els valors absoluts desapareixen amb la lesió i es recuperen amb la reinnervació; per aquesta raó les dades evolucionen des del 0% immediatament als 7 dies de la lesió després de la lesió fins a valors pròxims al 100%. S'ha determinat també les proporcions d'animals amb aparició de resposta en cada dia de seguiment.

En l'estudi electrofisiològic de l'especificitat de la reinnervació, s'ha calculat els percentatges de resposta funcional motora (amplitud del PAMC) sensorial (amplitud del PANC) i sudomotora (nombre de glàndules sudorípares activades) dels fascicles tibial, peroneal i sural respecte a la resposta total aconseguida per estimulació de tot el tronc del nervi ciàtic. S'ha determinat les proporcions d'animals amb innervació muscular, sensorial i sudomotora simple o múltiple i el grau de poliinnervació de dianes. Finalment s'ha expressat la proporció d'animals amb pluriinnervació de dianes.

L'amplitud de les respostes reflexes monosinàptiques (ona H) ha estat calculada en cada dia de seguiment com a percentatge de la resposta motora màxima del múscul (ona M) on s'ha registrat, configurant la ratio H/M. Posteriorment s'ha indicat a les taules l'evolució d'aquesta ratio d'amplituds H/M en relació al valor de la mateixa abans de l'operació. L'amplitud de les respostes reflexes polisinàptiques ha estat expressada com a percentatge de l'amplitud de la resposta control, donat que els registres es fan sobre músculs no denervats per la lesió, per a estudiar la seva recuperació i, normalitzats respecte del valor del PAMC del nervi tibial des del qual han estat evocats, per a quantificar el grau de facilitació de la resposta. L'estimació del temps de conducció perifèric-central de les respostes reflexes s'ha calculat per mitjà de la diferència entre les latències de les ones H i la M (lat H-lat M) en els reflexos monosinàptics i restant als temps de latència de cada component (C1, C2, C3) el temps de conducció de la via aferent sensorial (temps de latència del nervi tibial) i eferent motora ipsilateral o contralateral (temps de latència dels PAMCs) en els polisinàptics. Posteriorment s'ha indicat per ambdòs tipus de reflexos, l'evolució dels valors d'aquesta estimació respecte del valor que tenien abans de la lesió.

#### *Avaluació morfològica*

L'estudi amb retrotraçadors fluorescents de la reinnervació s'ha avaluat, d'una banda comparant quantitativament els comptatges absoluts de neurones motores dels grups experimentals amb els del grup control. També s'ha comparat el percentatge total de neurones marcades amb cada traçador i el percentatge de motoneurones amb diverses combinacions de dobles o triples marcatges respecte del total de neurones motores marcades, respecte al grup control i entre els diferents grups experimentals.

## 11. Valors absoluts controls

A continuació s'expressen els valors absoluts (mitjana  $\pm$  error estàdar) dels paràmetres funcionals que s'ha utilitzat per estudiar la regeneració i l'especificitat funcional de la reinnervació d'òrgans diana sudomotors (GS), nociceptius (ALG), musculars (PAMC), sensorial digitals (PANC) i la recuperació de la funció global de locomoció (WT) corresponents a rates Sprague-Dawley de 10-12 setmanes d'edat i 260 g de pes. Els valors absoluts de les respostes reflexes monosinàptiques (IV.5.1 i polisinàptiques (IV.6.1) i els comptatges de motoneurons espinals (IV.4.1), com que són objecte d'estudi d'aquesta mateixa tesi, s'han inclòs al seu corresponent apartat de resultats.

GS	$\alpha$	$\beta$	A	B	C	D	1	2	3	4	5	Total
GS	45,60	16,15	29,80	39,85	32,45	40,90	19,60	20,35	17,60	17,15	16,25	294,70
(n°)	(1,2)	(1,27)	(1,50)	(1,16)	(1,78)	(2,63)	(1,04)	(0,94)	(1,33)	(1,36)	(0,95)	(9,31)

ALG	Resposta Plantar
Llindar de retirada (°C)	41,38 $\pm$ 0,62
Temps retirada (segons)	10,74 $\pm$ 0,33
Temps de retirada D vs E (%)	101,76 $\pm$ 2,32

PAMC	m. Plantar	m. Gastrocnemi	m. Tibial
Amplitud Ona M (mV)	7,64 $\pm$ 0,28	42,25 $\pm$ 1,10	37,85 $\pm$ 0,86
Amplitud Ona H (mV)	0,88 $\pm$ 0,05	4,29 $\pm$ 0,41	3,62 $\pm$ 0,21
Latència Ona M (ms)	2,54 $\pm$ 0,06	1,30 $\pm$ 0,04	1,39 $\pm$ 0,04
Latència Ona H (ms)	7,17 $\pm$ 0,13	6,07 $\pm$ 0,20	7,26 $\pm$ 0,20

PANC	n. digital 4t dit	n. digital 5è dit	n. digital 2n dit	n. tibial (taló)
Amplitud Ona N ( $\mu$ V)	17,57 $\pm$ 0,46	19,95 $\pm$ 0,69	16,97 $\pm$ 0,40	156,73 $\pm$ 5,70
Latència Ona N (ms)	1,75 $\pm$ 0,04	1,77 $\pm$ 0,04	1,71 $\pm$ 0,05	1,06 $\pm$ 0,03

WT	Mesures empremta plantar
Print Length (mm)	(PL) 26,13 $\pm$ 0,29
Toe Spreading (mm)	(TS) 19,35 $\pm$ 0,31
Intermediary Toes (mm)	(IT) 10,31 $\pm$ 0,23
Index Funcional del Ciàtic (u.a)	(IFC) 7,04 $\pm$ 5,31