

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

Antoni Valero Cabré

Tesi Doctoral

1999

**V. Discussió**

La recuperació de la funció en la qual participa un nervi lesionat i les seves dianes distals motores, sensorials i autonòmiques no és un procés simple. La millora de paràmetres de reinnervació avaluats aïlladament no garantitza sempre la recuperació funcional global del subjecte. En aquesta memòria s'ha avaluat, en primer lloc i per mitjà de tècniques funcionals, morfològiques i conductuals, els efectes de lesions completes, per secció o resecció del nervi perifèric seguides de reparació per sutura, autoinjert o tubulització sobre la recuperació de paràmetres de reinnervació motora, sensorial i autonòmica. En segon lloc, s'ha quantificat la qualitat i especificitat de la reinnervació perifèrica i en tercer lloc, la recuperació de respostes reflexes monosinàptiques i polisínàptiques que participen en el control del moviment i que impliquen la reconexió central de les neurones aïllades per la lesió perifèrica del seu entorn neuronal. Paral·lelament s'ha mesurat al llarg de la reinnervació el nivell de recuperació de la funció global de deambulació que ve determinat pel major o menor grau d'èxit aconseguit per tots els aspectes esmentats anteriorment.

En treballs previs basats en models experimentals similars, s'ha abordat els problemes de la quantitat de la regeneració i la reinnervació després de diferents tipus de lesions i reparacions del nervi perifèric aplicant tècniques funcionals (Navarro et al 1994, Butí et al 1996, Labrador et al 1995, Rodríguez et al 1999a) o histològiques (Giannini et al 1989, Gómez et al 1996, Verdú i Navarro 1997). Altres autors han estudiat la qualitat i l'especificitat fascicular, troncular i d'òrgan diana de la regeneració axonal (Brushart 1988, 1993, Brushart et al 1998, Angelov et al 1993, 1996, 1999), així com els canvis estructurals i funcionals dels sistema nerviós central cortical i espinal després de lesions dels nervis perifèrics (Sumner 1978, Wall i Kaas 1986, Donoghue et al 1990, Sanes et al 1990, Doetsch et al 1996). Finalment, diversos estudis clínics i fonamentals s'han adreçat a avaluar la recuperació de funcions globals (Hrushka 1979, De Medinaceli et al 1982, Bain et al 1989, Wasserschaff 1990, van Meeteren 1998).

Malgrat l'extens conjunt de coneixements sobre els fenòmens moleculars i cel·lulars de la degeneració i regeneració nervioses, no sempre han conduït a l'obtenció de resultats d'aplicabilitat clínica (Fu i Gordon 1997). Per altra banda, s'ha posat de manifest la manca de correlació entre els resultats obtinguts en un mateix model de lesió per proves histològiques, funcionals i conductuals, que estudien diferents aspectes del complex procés de regeneració i reinnervació (Munro et al 1998). En aquest context, un dels objectius d'aquest treball ha estat l'avaluació de la importància de factors com: el grau de regeneració i reinnervació de dianes distals, l'especificitat de la reinnervació perifèrica i els canvis en la connectivitat central de reflexos espinals segmentaris sobre la recuperació global del subjecte, mesurada per la funció de locomoció. És d'aquesta manera que es pot obtenir informació d'utilitat clínica sobre l'eficàcia i els problemes de la regeneració i la reinnervació distal després de lesions del sistema nerviós perifèric.

## 1. Avaluació funcional de la regeneració després de lesions perifèriques

La utilització de tècniques neurofisiològiques que avaluin la reinnervació de diferents òrgans diana, com la musculatura esquelètica, els nervis sensorials, els receptors nociceptius cutanis i les glàndules sudorípares possibilita l'estudi de l'evolució i el nivell final de recuperació funcional de diferents tipus de fibres nervioses després de lesions i reparacions quirúrgiques dels nervis perifèrics. Després d'infringir lesions de compressió, secció i resecció seguides de reparació per sutures epineurials o tubulització amb diversitat de materials, tots els tipus de fibres estudiades en qualsevol dels 8 grups experimentals han aconseguit reinnervar les seves estructures diana distals, encara que amb diferències, segons la lesió i la reparació emprada, en la proporció d'animals amb èxit de regeneració, el nivell final assolit i la qualitat de la reinnervació. El nivell de recuperació funcional s'ordena, en general, de major a menor segons la gravetat de la lesió i l'eficàcia del tipus de reparació. La lesió per compressió és la que mostra de manera sistemàtica els millors resultats de recuperació. En lesions de secció, la sutura directa obté valors quantitativs lleugerament millors que la tubulització, mentre que la sutura creuada produeix, especialment en alguns tipus de fibres, efectes marcadament inferiors. En lesions de resecció, l'autoempelt de ciàtic i la tubulització amb guies reabsorbibles de PLC obtenen valors de recuperació equivalents, mentre que tant la tubulització simple com la fascicular amb tubs de silicona dona lloc a resultats inferiors de reinnervació funcional. No tots els tipus de fibres nervioses mostren la mateixa capacitat i velocitat de regeneració i reinnervació perifèrica. Així, la reinnervació aconseguida per fibres nervioses primes, nociceptives i simpàtiques, comença abans i assoleix nivells de recuperació finals superiors que la de fibres nervioses gruixudes mielíniques, motores i sensorials. La reinnervació segueix una progressió proximal-distal de manera que, per a tipus equivalents de fibres nervioses, les dianes musculars o nervioses localitzades en punts més propers a la zona de lesió recuperen la funció abans que les més allunyades.

### 1.1. Aspectes metodològics de l'avaluació funcional de la regeneració i la reinnervació

Les tècniques utilitzades per avaluar la reinnervació perifèrica de diferents tipus de fibres després d'una lesió nerviosa permeten obtenir dades comparables i establir diferències entre les capacitats regeneratives. L'amplitud dels PAMC i PANC registrats després d'estimulació elèctrica proximal del nervi, el recompte de GS reactives a l'estimulació colinèrgica i el temps de retirada a un estímul dolorós són, tots ells, indicatius del grau de regeneració i de l'efectivitat de la reinnervació distal de fibres motores, autonòmiques i sensorials. Cal tenir en compte però, que no totes les proves presenten la mateixa sensibilitat ni especificitat. El registre electromiogràfic de PAMC i el nombre de GS reactives donen resultats quantitativs i reproduïbles. El registre de PANC així com el temps de latència dels potencials d'acció presenten una major variabilitat, atribuïble a la baixa amplitud del senyal a detectar en fases de regeneració inicial i a petites variacions existents en la posició dels elèctrodes de registre i estimulació (Navarro et al 1994a, 1996). L'algesimetria tèrmica aporta resultats quantitativs, però les condicions d'experimentació i l'aprenentatge de l'animal poden influir en els seus valors, produint una elevada variabilitat intergrup al llarg del seguiment que obliga a

comparar cada dia els valors de la pota lesionada amb la pota contralateral. A més, si es repeteix consistentment l'estímul, s'observa una tendència a la reducció del temps de retirada, que demostra que els subjectes han estat condicionats i han après a respondre a l'estímul tèrmic abans que aquest arribi a un nivell nociu (Hargreaves et al 1988, Galbraith et al 1987, Verdú et al 1999).

Tots els mètodes funcionals emprats permeten l'avaluació a diferents intervals de seguiment sense haver de sacrificar l'animal o influir negativament en el procés regeneratiu. El seguiment en paral·lel d'un grup control, que ha mostrat valors relativament estables, corrobora que es tracta de proves inòqües per a l'animal, de manera que la seva realització repetida no afecta els resultats del següent dia d'avaluació. Algunes de les variacions més òbvies que presenta el grup control al llarg del seguiment de 3 mesos són justificables en funció de la maduració i desenvolupament del sistema neuromuscular en rates, que progressa lentament des de l'edat adulta jove fins als 12 mesos postnatsals. D'acord amb d'altres treballs realitzats en rosegadors, s'observa una reducció del temps de latència dels PAMCs i PANCs, per l'increment de la velocitat de conducció producte de la major mielinització axonal (Sato et al 1985, Fraher et al 1990, Verdú et al 1996). Els nostres resultats mostren també un augment no significatiu de l'amplitud dels PAMCs i dels PANCs atribuïble al creixement corporal i a l'increment de la massa muscular i nerviosa que no es referència en altres treballs. En quant al nombre de GS, així com el volum de suor, activades per estimulació colinèrgica i elèctrica es manté estable en el rang d'edats dels animals utilitzats, malgrat que s'ha observat en edats més avançades una tendència a la reducció (Verdú et al 1996). La relativa estabilitat dels diferents paràmetres utilitzats en animals seguits entre les 8 i les 20 setmanes postnatsals demostra la fiabilitat i limitada variabilitat interindividual de les mesures finals realitzades.

El gran avantatge de les proves funcionals sobre les histològiques és que no es limiten a donar una estimació dels axons del nervi lesionat que han estat capaços de regenerar a través de la zona de lesió, sinó també de les fibres que en un temps determinat d'evolució han regenerat pel nervi distal i reinnervat les estructures diana. La majoria dels paràmetres (com GS, ALG i PAMCs) recullen la resposta de l'òrgan perifèric reinnervat i, per tant, aporten una indicació de la quantitat d'axons regeneratius que propaguen potencials d'acció i han establert sinapsis funcionals. Com excepció, la detecció de PANCs sobre els nervis demostra l'arribada d'axons regenerats en el punt de registre però no implica la reinnervació funcional dels receptors sensorials. Finalment, l'algesimetria a més de posar de manifest la reinnervació cutània per axons nociceptius, demostra que la reconexió distal permet disparar el circuit polisinàptic del reflex de retirada que té com a òrgan efector la musculatura de l'extremitat avaluada.

La demostració per mitjà de proves funcionals d'una reinnervació completa o quasi completa no és indicativa, però, de la regeneració i reinnervació adequades de tots els axons lesionats. La incapacitat d'alguns axons per contactar amb els seus òrgans distals estimula la col·lateralització d'axons que sí han regenerat i l'establiment de connexions aberrants o inespecífiques, que a efectes quantitius, incrementen la ratio de connexions entre axons i cèl·lules diana diverses vegades sobre el seu valor

normal (Brown et al 1980, Devor i Govrin-Lippmann 1979, Kennedy et al 1988, Kennedy i Sakuta 1984, Thomson i Jansen 1977). En tot cas, la incapacitat dels diferents grups experimentals, especialment d'aquells sotmesos a lesions de resecció, per assolir valors iguals o propers als normals preoperatoris és una indicació clara que les capacitats neuronals de regeneració i de col·lateralització han estat sobrepassades.

## **1.2. Efecte de diferents tipus de lesions i reparacions sobre la regeneració i la reinnervació**

La severitat de la lesió afecta la supervivència de les neurones perifèriques i el grau de recuperació funcional aconseguit per regeneració dels axons sobrevivents. Diferents factors com el tipus de neurona, l'edat i el grau i proximitat de la lesió al soma neuronal influeixen la seva mortalitat. Les motoneurones espinals són menys susceptibles a la denervació que les cranials i en tot cas que les seves equivalents sensorials del gangli de l'arrel dorsal i rarament sofreixen mortalitat en animals adults com els utilitzats en el nostre estudi (Melville et al 1989, Gordon et al 1991, Fu i Gordon 1997). Diferents autors han descrit però una major sensibilitat a la mort de les neurones motores de diàmetre més petit com les motoneurones g (Devor i Govrin-Lippmann 1979, Brushart i Mesulam 1980, Swett et al 1991). Per contra, altres estudis descriuen una mortalitat per apoptosi de fins el 50% de neurones sensorials del gangli de l'arrel dorsal després d'una secció perifèrica, que es produiria de manera progressiva a la llarg dels 6 mesos posteriors a la secció quan no es permetia la regeneració distal (Melville i Coggeshall 1989, Groves et al 1997). La supervivència neuronal depèn de l'exposició a factors neurotròfics de la glia central i perifèrica que aconsegueixin compensar de manera relativament ràpida la desconexió de la neurona dels seus òrgans diana. Així la ràpida elongació cap al segment distal i la reinnervació de dianes adequades són fonamentals per a la supervivència neuronal (Fu i Gordon 1997). Lesions perifèriques com les aplicades en el nostre estudi, localitzades a una distància de més 20 mm dels somes neuronals espinals i del gangli de l'arrel dorsal en rates adultes, no fan pensar en nivells considerables de pèrdua de neurones postaxotomia. En tot cas, no s'ha dut a terme cap prova específica per a quantificar aquest efecte, que podria explicar al cap de 3 mesos de la lesió perifèrica la insuficient recuperació que s'observa especialment en els grups de resecció reparats per tubulització. Els recomptes del nombre total de motoneurones marcades amb algun traçador corresponents a l'apartat dedicat a l'estudi histològic de l'especificitat de la reinnervació demostra després de reseccions, disminucions inferiors al 15% de motoneurones respecte del grup control. Si bé es pot pensar en la mort o les alteracions metabòliques com a causants d'aquest efecte, no es pot descartar que estigui expressant diferències interindividuals en el nombre total de neurones motores. Alguns estudis han demostrat que l'exposició a fragments del segment distal en lesions de transecció del nervi ciàtic és capaç de disminuir la mort associada de neurones sensorials (Melville et al 1989). Així, els grups de resecció reparats per tubulització de distàncies de 8 mm pateixen durant més temps l'absència d'una font perifèrica de factors tròfics, fet que podria derivar en la mort d'algunes neurones. Per contra, en lesions per compressió o secció en les quals es manté la continuïtat entre els extrems proximal i distal, la mort de motoneurones és inexistent (Swett et al 1991). L'especificitat de la reinnervació perifèrica també pot influir sobre la

supervivència neuronal. En lesions de compressió en les quals es conserva l'alineament de tubs endoneurials, es garantitza una regeneració ràpida i específica que afavoreix la supervivència. Per contra, en lesions de secció reparades amb una sutura creuada iatrogènica o de resecció, en les quals el nombre d'axons que es projecten sobre dianes no adequades i amb les quals no podran establir sinapsis s'incrementa, aquests axons mancats de la font de factors tròfics poden acabar degenerant i produir la mort cel·lular (Purves 1975, Brushart 1989, 1993, McMahon i Gibson 1987).

Després d'una secció nerviosa les beines epineurials, perineurials i endoneurials queden afectades i té lloc una retracció elàstica dels extrems nerviosos. La formació d'una cicatriu fibrosa pot obstaculitzar el creixement dels axons regeneratius fins al segment distal i posteriorment als seus òrgans diana (Sunderland 1991, Fu i Gordon 1997). Tal i com demostren els nostres resultats, el grau de recuperació aconseguit després d'una lesió compressiva en la qual es manté intacta la làmina basal que envolta cada fibra nerviosa (Haftek i Thomas 1968) és sempre superior al de lesions més severes que comporten la disrupció de les beines connectives. A més, l'increment del grau de discontinuïtat axonal produït per la lesió disminueix la probabilitat de conduir els axons regeneratius cap als tubs endoneurials distals dificultant la supervivència axonal (Miller et al 1989) i donant lloc a fenòmens de reinnervació aberrant o inefectiva de dianes equivocades (Devor i Govrin-Lippmann 1979, De Medinaceli 1988, Swett et al 1991). Quan es procedeix a la sutura dels extrems del nervi seccionat, s'elimina la distància interneural i s'afavoreix l'èxit del procés regeneratiu, encara que la dificultat per travessar la cicatriu generada per la reparació enlenteix la regeneració i afavoreix la pèrdua d'axons que creixen per fora les beines neurals (Krarup i Loeb 1988).

D'acord amb els resultats d'aquest estudi, la taxa de regeneració varia en funció de la severitat de la lesió nerviosa infringida (Legrain 1977, Davies et al 1979). Després d'una compressió, els axons lesionats s'elonguen distalment a una velocitat de 2,1 mm/dia mentre que després d'una secció, la velocitat de regeneració no ultrapassa els 1,4 mm/dia (Legrain 1977). Aquest fet explica entre d'altres raons que el grup de compressió presenti la dinàmica més ràpida de regeneració i reinnervació de tots els grups operats. Els valors de velocitat regenerativa dels diferents grups estudiats se situen a l'entorn dels valors definits per Legrain (1977) i lleugerament per sota dels definits per Gutmann entre 3-4 mm/dia (Gutmann et al 1942). Donat que la distància a recórrer des del punt de lesió fins la planta del peu és d'uns 80 mm i tenint en compte que no s'ha seguit amb suficient periodicitat els animals, el grup de compressió presenta als 60 dpo nivells significatius de reinnervació motora, sensorial i autonòmica, el que indica que els primers estadis de la reinnervació han tingut lloc entre els 30 i 60 dpo a una taxa global entre 1,4-2,8 mm/dia. Els grups de secció mostren recuperació plantar a partir tot just dels 60 dpo, fet que permet calcular una taxa regenerativa a l'entorn de 1,4 mm/dia. Finalment, els grups de resecció mostren una velocitat equivalent a la dels de secció per a la reparació per empelt, mentre que la tubulització aporta una velocitat menor, ja que només entre els 60 i 90 dpo s'observen els primers signes de recuperació distal. La regeneració a través de l'espai buit de la cambra neural, determina un retard inicial necessari per formar una matriu inicial de fibrina que es colonitzarà posteriorment per fibroblastes i CS, generant un entorn promotor de la regeneració

(Williams 1983, Butí 1994). La reparació per sutura o per empelt produeix una certa reacció cicatricial en les línies de sutura que causa també un retard inicial per travessar aquesta regió, encara que menor. A més de les causes locals, el tipus de lesió influeix el nivell de síntesi proteica i la velocitat de transport axonal (Redshaw i Bisby 1985), de manera que el component lent del transport axonal anterògrad, que augmenta després de l'axotomia per aportar els biomaterials que els cons de creixement necessiten per la seva elongació, és dues vegades més elevat després d'una lesió per compressió que per secció (Frizell i Sjostrand 1981).

En tots els grups estudiats s'observa que la recuperació de la latència de conducció (grau de mielinització) d'axons motors i sensorials presenta una recuperació més lenta però assoleix al final del seguiment valors més propers als preoperatoris que l'amplitud dels potencials (nombre d'axons regenerats). Models matemàtics postulen que les modificacions de l'amplitud dels potencials musculars compostos haurien de ser inversament proporcionals a la reducció de la latència elevada al quadrat (Davis et al 1978). Durant la regeneració però, en acord amb els nostres resultats, es demostra que l'amplitud es recupera per sota de la latència dels PAMC sense acomplir les prvisions d'aquest model predictiu. La maduració i mielinització dels axons té lloc una vegada l'axó ha reestablert una sinapsi amb les seves dianes distals fet que explica aquest retard en la recuperació de la latència que va directament lligat a la lenta recuperació del diàmetre axonal (Cragg i Thomas 1964, Davis et al 1978, Smith i Hall 1980). Diversos autors han descrit que després de lesions de compressió, els axons que aconsegueixen reinnervar les seves dianes mostren un augment del diàmetre axonal fins a valors lleugerament inferiors als controls. Aquesta recuperació permet unes velocitats de conducció d'axons regeneratius del 75% de l'original (Cragg i Thomas 1964), lleugerament inferiors a les que s'han trobat en aquest estudi pel grup de compressió. Després de lesions de resecció reparades per empelts i guies neurals s'observa que les fibres regeneratives mostren per contra un diàmetre axonal mitjà del 75% dels d'animals controls i una reducció més marcada de la velocitat de conducció (Pover i Lisney 1988, Gómez et al 1996). També s'observa un increment de la distància internodal en tota mena de fibres mielíniques (Cragg i Thomas 1964) que no es recupera amb la reinnervació i, en d'altres estudis, un increment reversible amb la desmielinització del període refractari de fibres mielíniques (Smith i Hall 1980), fet que explica que la normalització de diàmetres no comporti necessàriament la renormalització de la velocitat de conducció (Cragg i Thomas 1964).

Per contra, l'amplitud dels potencials es recupera en la mesura en què el contingent d'axons lesionats aconsegueix regenerar i reinnervar les seves dianes perifèriques de manera funcional, i el seu nivell depèn del nombre i tipus d'axons regenerats. En cap dels grups estudiats sotmesos a lesions lleus de compressió o secció s'ha trobat una recuperació de l'amplitud dels PAMCs ni dels PANCs equivalent als valors originals. Aquest fet pot atribuir-se per una banda a una certa pèrdua de motoneurons que no han sobreviscut a la lesió (Swett et al 1991) o bé a motoneurons que aconseguint de sobreviure no han regenerat o s'han projectat sobre músculs diferents als originals (Brushart i Mesulam 1980, Gordon et al 1991). En tot cas, la força desenvolupada pel múscul

reinnervat avaluada amb un dinamòmetre pot arribar a valors propers o superiors als originals fins i tot quan l'amplitud del PANC del seu nervi motor es manté significativament més baix que els nivells preoperatoris (Davis et al 1978, Gordon et al 1991). Les nostres dades mostren una menor recuperació del PANC del nervi tibial a nivell del taló que del PAMC dels diferents músculs estudiats. Les unitats motores regeneratives innerven un nombre de fibres musculars més gran que l'original amb una raó de fibres musculars per axó clarament superior a l'original que compensa la pèrdua d'unitats motores produïda per la lesió o la reinnervació aberrant (Gordon et al 1991). Donat que la força desenvolupada per una unitat motora individual es directament proporcional al quadrat de la seva amplitud i a la seva àrea de secció total (nombre de fibres musculars x àrea de secció mitjana de les fibres), amb un nombre d'unitats motores menor es pot arribar a desenvolupar el mateix grau de força o tensió muscular (Tötösy de Zepetnek et al 1990, Rafuse i Gordon 1998). Després de secció i sutura, les unitats motores regeneratives incrementen entre 2-3 vegades de manera generalitzada la mida de les seves unitats motores en comparació amb les 5-8 vegades en cas de lesions parcials per mitjà de motoneurons no lesionades veïnes. S'ha demostrat també que la capacitat de compensar la denervació per pèrdua d'unitats motores amb la innervació col·lateral d'axons sobrevivents depèn del nombre d'unitats remanents. Així, quan la pèrdua o la reinnervació aberrant afecta més del 70% de les unitats motores la reinnervació col·lateral deixa de ser efectiva i no permet aconseguir la recuperació del nivell total de força (Gordon et al 1991, Rafuse i Gordon 1998). Les nostres dades de recuperació de l'amplitud reflecteixen una bona correlació amb el nombre d'unitats motores que reinnerven el múscul en lesions lleus (compressió), en les quals la mort neuronal i els errors de reinnervació són escassos, o bé en les molt greus (resecció), en les quals aquest mateixos factors redueixen la possibilitat de compensació per ramificació terminal. Per contra en lesions de severitat intermitja (>70% d'unitats motores que es projecten sobre la musculatura correcta) la recuperació de l'amplitud del PAMC no reflecteix de manera proporcional el nombre d'unitats motores reinnervades. D'acord amb diversos estudis previs (Brenan et al 1988, Buehler et al 1990, De Medinaceli 1988, Gutmann 1942, Gutmann i Guttmann 1942, Navarro i Kennedy 1989, Povlsen et al 1993, Romano et al 1991), s'ha evidenciat que la reinnervació de dianes motores (m. plantar), sensorials (n. digitals), sudomotores i nociceptives a nivell plantar es presenten en tots els grups estudiats més tardanament que la verificada en dianes equivalents de posicionalment més proximal. A més, els nivells de recuperació al final del seguiment són també inferiors en els registres distals que els proximals. La reinnervació proximal muscular (m. gastrocnemi i m. tibial anterior) i nerviosa (n. tibial) no discrimina de manera acurada entre diferents graus de lesió ni l'eficàcia del procediment reparatiu emprat, degut a que la proximitat del teixit diana facilita l'arribada d'un nombre elevat d'axons regeneratius, independentment de l'agressió que hagin sofert, ja en fases molt inicials del seguiment. Per tal de poder estudiar amb una certa fiabilitat l'eficàcia d'un procediment terapèutic sobre la regeneració i la reinnervació nerviosa perifèrica, es pot optar o bé per utilitzar una lesió de gran severitat sobre la qual el procediment que es preten superar amb l'avaluat no hagi demostrat reinnervació al cap d'un determinat temps de seguiment, o bé, optar per avaluar paràmetres de reinnervació a nivell distal en lesions no limitants.

### *1.2.1. Lesió compressiva no intervinguda*

El grup sotmès a una compressió nerviosa mostra millors resultats de recuperació de les funcions mediades per fibres motores, sensorials i autonòmiques que la resta de grups de secció i resecció. Aquests resultats coincideixen amb estudis previs histològics, electrofisiològics i conductuals realitzats en diferents espècies animals i models de nervis (Guth 1962), Gutmann i Guttmann 1942, Cragg i Thomas 1964, Devor i Govrin-Lippmann 1979, Purves 1975, Mira 1976, Davis et al 1978, De Medinaceli 1988, Navarro et al 1994, Swett et al 1991, Verdú et al 1994b, Meyer et al 1997). El manteniment de la integritat dels tubs endoneurials, el contacte ràpid amb el nervi distal, l'absència de mort neuronal (Swett et al 1991) i l'elevada velocitat d'elongació (Legrain 1977) justifiquen l'elevada rapidesa, quantitat i qualitat de la reinnervació perifèrica. En acord amb els nostres resultats, la majoria d'estudis demostren la recuperació ràpida del nombre i el diàmetre de les fibres nervioses, de la seva mielinització i de la velocitat de conducció fins a nivells molt semblants als prelesionals (Cragg i Thomas 1964, Jenq i Coggeshall 1985, Giannini et al 1989). Les lesions compressives corresponents al segon grau de la classificació de Sunderland (1978) afecten la continuïtat axonal produint degeneració walleriana, però preserven els tubs endoneurials i la membrana basal de les CS, raó per la qual la regeneració s'inicia ràpidament i la reinervació segueix una dinàmica ràpida. Tal i com demostren els nostres resultats, aquestes lesions no requereixen de tractament especial i evolucionen espontàniament a la recuperació en pocs mesos (Seddon 1949, Sunderland 1991, Omer et al 1998).

### *1.2.2. Reparació per sutura directa i tubulització de gaps curts*

És un criteri clínic ben establert que a partir de lesions de grau III de Sunderland la reinnervació d'òrgans diana distals es produeix sempre i quan es practiqui una reparació quirúrgica que posi en contacte adequadament els extrems neurals distals i proximals (Sunderland 1991). Diferents estudis han demostrat per mètodes histològics i funcionals, que la no reparació d'una lesió perifèrica en la qual es produeix una pèrdua de la discontinuïtat del nervi i una separació dels extrems neurals per retracció o resecció no evoluciona espontàniament a la recuperació i comporta el fracàs de la regeneració i la formació de neuromes (Henry et al 1985, Butí et al 1996, Gómez et al 1996, Labrador et al 1995). En cas que la distància interneural permeti l'aproximació sense tensió dels extrems nerviosos, es practica habitualment una sutura directa epineurial com a mètode reparatiu (Sunderland 1991). Com a alternativa, s'ha assajat en aquest estudi la tubulització nerviosa amb una guia de silicona, material impermeable. Aquest procediment, presenta en tots els paràmetres estudiats valors inferiors, encara que no sempre amb diferències estadísticament significatives, als obtinguts per la sutura directa. Pel que fa a la dinàmica de la recuperació s'ha observat un lleuger retard inicial del grup tubulitzat atribuïble a una menor velocitat de regeneració inicial dels axons en l'espai tubular buit derivat del temps necessari perquè es formi la inicial matriu de fibrina (Williams 1983, Butí et al 1996, Butí 1994). Respecte a l'eficàcia d'aquesta tècnica alternativa en distàncies interneurals curtes, altres treballs confirmen que lesions equivalents reparades per sutura directa o per tubulització presenten nivells de recuperació finals similars (Gibby et al 1983, Ashur et al 1987, Evans et al 1991, Romano et al 1991, Navarro et al 1994b, Archibald et al 1995, Butí et al 1996). La

discordança parcial dels nostres resultats amb els esmentats pot venir donada pel fet que s'ha comparat la tubulització amb la sutura directa realitzada conservant la mateixa orientació original dels fascicles i procurant limitar el traumatisme de les agulles (Meyer et al 1997) i immediatament després de la secció, limitant així la retracció que condiciona l'aparició d'una relativa tensió. Tenint en compte aquests condicionants, hi ha diverses raons que justificarien l'ús d'una reparació per tubulització fins i tot en aquells casos on la sutura directa dels extrems nerviosos fos possible. Per una banda, evita la tensió resultant de la sutura directa, és capaç de limitar la cicatriu fibrosa postlesió i evitar l'atrapament dels axons lesionats (Ashur et al 1987). Per altra banda, segons alguns autors, presenta una menor problemàtica associada a l'alineament incorrecte dels fascicles en cas que hi hagi el risc de practicar una reparació incorrectament orientada dels extrems, donat que els axons gaudeixen d'un espai lliure per corregir la seva trajectòria vers el fascicle distal adequat (Evans et al 1991). Finalment, la tècnica de tubulització és més senzilla d'aplicar per cirurgians inexperts o en situacions d'urgència que exigeixin una sutura ràpida i es pot considerar un procediment transitori que manté localitzables els extrems nerviosos en espera d'una bona sutura diferida (Dellon i Mackinnon 1988, Doolahb 1996).

### *1.2.3. Reparació per sutura creuada*

En la reparació per sutura directa d'una secció d'un nervi plurifascicular com el tronc del ciàtic es corre el risc de no aconseguir una adequada orientació dels dos extrems a suturar. Una reparació forçada que no respecti l'alineament originals dels fascicles anatòmics i dins de cadascun d'ells les diferents poblacions d'axons motors, sensorials i autonòmics que els conformen poden produir efectes desastrosos sobre els resultats de la reinnervació (Sunderland et al 1991, Omer et al 1998). Al mateix temps, la reinnervació de territoris distals desconnectats per una lesió perifèrica que impedeix la resutura o la col·locació d'un empelt pot promoure's mitjançant la sutura de l'extrem distal o del mateix múscul al cap proximal d'un nervi intacte d'importància funcional prescindible, tècnica coneguda com a neurotització nerviosa o muscular (Sunderland 1991, Pi et al 1999). Així, en cas de lesions abulsives del plexe braquial es resuturen els extrems proximals dels nervis intercostals alts a l'extrem distal del nervi músculo-cutani per tal d'afavorir la reinnervació del bíceps i aconseguir recuperar un grau relatiu de flexió de l'avantbraç (Sunderland et al 1991), mentre que és una tècnica corrent per a la reinnervació de la musculatura facial l'anastomosi del nervi hipoglòs sobre l'extrem distal del nervi facial seccionat (Fujito et al 1989, Angelov et al 1993, Gruart et al 1996). En aquesta memòria es va decidir aplicar una sutura creuada dels fascicles peroneal i tibial cap a extrems oposats que són ambdós cordons mixtes que contenen axons motors, sensorials i simpàtics. La sutura forçadament equivocada d'aquests dos fascicles permet mesurar, d'una banda, la capacitat d'axons d'un determinat tipus de reinnervar aberrantment dianes de teixit corresponent (per exemple, axons motors del nervi tibial que innervin musculatura extensora com el tibial anterior) i per un altre costat, l'habilitat de reinnervar dianes que no corresponen al tipus d'axons (axons sensorials i motors del fascicle peroneal que reinnervin dianes autonòmiques com les glàndules sudorípares de la regió plantar) (Gordon et al 1986, Gerding et al 1987, Brushart 1993, De la Cruz et al 1996).

Diversos treballs han abordat la recuperació funcional d'axons motors que reinnerven dianes tissularment equivalents però diferents a les originals. Per contra són escassos els estudis realitzats en fibres sensorials o autonòmiques. En diferents treballs histològics i funcionals s'ha demostrat que motoneurons del nervi hipoglós poden reinnervar funcionalment la musculatura facial després d'una anastomosi hipoglós-facial (Angelov et al 1993, Gruart et al 1996), i que neurones motores espinals de músculs flexors poden reinnervar dianes extensores i a l'inrevés després de reparacions per sutura creuada (Gerding et al 1977, Gordon et al 1986, Evans et al 1991). També s'ha demostrat la capacitat de motoneurons de músculs ràpids com el gastrocnemi de reinnervar, després de lesions, músculs lents com el soli (Foehring et al 1987), de motoneurons del diafragma de reinnervar musculatura estriada de l'avantbraç (Fujito et al 1989) i fins i tot regions cutànies (Nishimura et al 1991). La sutura invertida dels fascicles tibial-peroneal genera a més de canvis de la innervació muscular, un patró d'innervació parcialment creuada de territoris sensorials (Gordon et al 1986). La reinnervació de dianes musculars i sensorials per part d'axons de tipus equivalent però diferents als originals és possible però sempre resulta quantitativament inferior i menys eficaç en el desenvolupament de la funció (Gerding et al 1977, Gordon et al 1987). Així en rates postnatsals, el grau de força desenvolupat pel múscul gastrocnemi medial reinnervat simultàniament per axons del fascicle tibial i peroneal, prèviament neurotitzats sobre el punt motor del múscul, és significativament superior en el primer cas malgrat que el nervi peroneal és capaç d'establir amb ell sinapsis funcionals (Gerding et al 1977). En acord amb aquestes observacions, la reinnervació muscular i sensorial (amplitud dels PAMCs i PANCs) ha assolit en el nostre treball nivells inferiors als de la reparació equivalent per sutura directa (amb una correcta alineació dels extrems). Paradoxalment, però, pel que fa a funcions mediades per fibres primes, la recuperació de la funció sudomotora ha estat amb diferència la més baixa de tots els grups experimentals estudiats, inclosos els de resecció, mentre que la recuperació de la nocicepció per fibres nervioses de diàmetre semblant ha mostrat resultats equivalents al grup de tall i sutura. D'altra banda, els axons sensorials i motors del peroneal (en absència d'innervació autonòmica) no poden reinnervar les glàndules a les quals són dirigits pel fascicle tibial, mentre que els axons sudomotors tibials són dirigits per l'extrem distal peroneal a territoris dorsals de pell pil·losa en la qual no hi ha GS, posant de manifest l'existència d'una reinnervació que mostra una gran especificitat tissular (Brushart 1998).

L'eficàcia de la innervació després d'una sutura creuada no és totalment comparable a l'obtinguda per un tall i sutura correcta, perquè el nombre d'axons dels fascicles creuats quirúrgicament no sempre és equivalent. Si, per una banda, els axons de l'extrem proximal que es projecta sobre un extrem distal de major cal·libre i amb un nombre superior de tubs endoneurials es troben amb un substrat que afavoreix més la col·lateralització (Angelov et al 1993), aquest és reinnervat per un nombre d'axons molt menor que hauran de projectar-se sobre territoris diana més extensos (Gordon et al 1987, Evans et al 1991), fet que limita el volum i la capacitat de reinnervació. Així, en el nostre model experimental, la musculatura flexora (m. plantars i gastrocnemi) rep per via del nervi peroneal un contingent d'axons mielínics (aproximadament 2.000-3.000 axons del fascicle peroneal) molt inferior al que rep habitualment (7.000-7.800 axons procedents del tibial), mentre que, per contra, sobre la

musculatura extensora (m. tibial anterior i altres) es projecta un nombre d'axons marcadament superior (Mackinnon et al 1985b, Schmalbruch 1986). L'efecte avantatjós de rebre un contingent d'axons superior a l'original fa que el múscul tibial anterior mostri una pendent inicial de reinnervació superior a la del gastrocnemi, encara que a mesura que passa el temps, les diferències es redueixen per la col·lateralització que el segment distal tibial promou sobre els axons del peroneal i també perquè un cert nombre d'axons originals del tibial creixen pel seu nervi distal original, degut a la diferència de tamany dels segments distals i la cicatriu en la línia de sutura. Al final del seguiment, ambdós músculs mostren valors de PAMC molt semblants als obtinguts pel grup de tall i sutura correcta. Les nostres dades sobre el nombre de motoneurons dels nuclis espinals de cadascun d'aquests dos músculs al final del seguiment demostren que el múscul tibial anterior ha estat reinnervat per un nombre de motoneurons superior al del gastrocnemi (46% vs 33% del total de comptabilitzades), fet que indica que la major col·lateralització distal és responsable de la superior recuperació de l'amplitud del gastrocnemi respecte del tibial anterior. Les nostres dades demostren que amb la sutura creuada completa no s'aconsegueix una inversió completa del patró de projeccions. Sempre hi ha un petit contingent d'axons que malgrat les sutures aconsegueix recol·locar-se al seu fascicle original (Gerding 1977, Gordon et al 1991, Evans et al 1991, Angelov et al 1993, Gruart et al 1996). Així, l'escàs nombre de GS activables s'explica per axons sudomotors del nervi tibial que han aconseguit escapar a la sutura i elongar-se a través del fascicle distal corresponent o, menys probablement, per col·lateralització terminal des de territoris dorsals als plantars dels dits i el palmell.

La desconexió perifèrica per axotomia de l'element postsinàptic indueix una pèrdua d'eficàcia sinàptica de les vies locals que modulen la descàrrega de la neurona axotomitada i, finalment, una disminució de la seva freqüència de despolarització (De la Cruz et al 1994, 1996, Moreno-López et al 1997) que es pot explicar per fenòmens d'aïllament dendrític o *stripping* glial (Pastor et al 1997). La reconexió perifèrica o la reinnervació de noves dianes es relaciona amb el restabliment de la densitat habitual de terminacions sinàptiques i la normalització progressiva del patró de descàrrega, fins i tot quan projecten sobre dianes tissularment diferents (Nishimura et al 1991, De la Cruz et al 1996). És una qüestió però encara controvertida en quina mesura el restabliment de sinapsis és un procés dependent de les característiques dels òrgans diana i en quina mesura les neurones que projecten i sinapten després de la reinnervació sobre dianes diferents a les originals tenen capacitat per adaptar el seu patró de freqüència de descàrrega a les demandes del seu nou òrgan perifèric (De la Cruz et al 1996). A favor de l'adaptabilitat juga el fet que en sutures creuades de la innervació de músculs ràpids i lents (gastrocnemi-soli) els potencials d'acció de les motoneurons ràpides s'adapten a les noves dianes i mostren una fase d'hiperpolarització tardana allargada típica de les lentes (Foehring et al 1987). També alguns treballs han demostrat que reinnervació del múscul bíceps en gats per mitjà d'una anastomosi frènic-músculocutani mostra al cap de 6 mesos una dissociació dels moviments de flexió de l'avantbraç i les contraccions rítmiques del diafragma en moviments voluntaris (Fujito et al 1989), encara que no durant la deambulació. Per contra, en els estudis d'anastomosis hipoglòs-facial, les motoneurons són incapaces de readaptar el seu complex

programa motor per al control muscular de la llengua durant la fonació, mastegació o deglució (freqüències d'oscil·lació entre 3-4 Hz) als requeriments d'un múscul com l'orbicular dels ulls que genera oscil·lacions molt superiors (25Hz) (Gruart et al 1996). Finalment, en acord amb els nostres resultats en rates, s'ha pogut observar que després d'una sutura creuada dels fascicles tibial i peroneal en gats, s'observa un patró d'activació motoneuronal parcialment invers i sobreposat durant la deambulació i una locomoció alterada que no es modifica al llarg de 2 anys de l'operació (Gordon et al 1986).

#### *1.2.4. Reparació per autoinjert i per tubs de silicona de reseccions del nervi ciàtic*

Si la retracció o la pèrdua de teixit neural per la lesió deixen una distància o *gap* interneural superior als 2 cm en nervis humans, s'opta per la interposició d'un empelt nerviós com a tècnica de reparació. L'injert constitueix una guia mecànica i un ambient que afavoreix l'avenç dels axons gràcies a la presència de CS i factors tròfics locals. Com a alternativa, s'ha assajat la reparació amb guies artificials de diferents materials (Fields et al 1988), entre els quals els tubs de silicona s'han erigit com a estàndar per la seva disponibilitat i facilitat d'implantació (Lundborg et al 1992, 1997, Butí et al 1996). El tub de reparació constitueix només una guia mecànica externa i la seva llum permet la regeneració axonal només si prèviament és coberta per una matriu connectiva repoblada per CS i fibroblastes (Longo et al 1984, Williams 1983) fet que retarda inicialment la regeneració i en distàncies interneurals llargues, també l'entrada en contacte amb l'extrem distal i l'elongació perifèrica fins als òrgans diana. El tub a més de servir de guia del creixement axonal, concentra al seu interior factors promotors de la regeneració produïts per l'extrem distal (Williams et al 1984, Longo et al 1984). La dependència neuronal però, de fonts perifèriques de factors tròfics que facin possible la seva supervivència converteix el temps d'elongació dels axons a través de la guia neural fins a l'extrem distal en un factor crític de l'èxit de la regeneració i la reinnervació perifèriques. Donat que el temps d'elongació a través del tub depèn principalment de la longitud del *gap*, diferents autors han definit que els 4 mm per al ratolí, els 10 mm per a la rata i entre 20-30 mm en primats serien les distàncies limitants a partir de les quals no es produeix la regeneració axonal espontàniament a través d'una guia de silicona (Butí et al 1996, Lundborg et al 1982a, Müller et al 1987, Dellon i Mackinnon 1988). Els nostres resultats demostren que en paràmetres mediat per fibres gruixudes els grups de resecció presenten un inici de recuperació funcional més tardà i assoleixen nivells finals inferiors que els del grup d'empelt. Així diversos autors han establert que a nivell morfològic, la separació entre els extrems d'un nervi seccionat disminueix el nombre d'axons mielínics que poden arribar a regenerar al segment distal (Jenq i Coggeshall 1984, 1985). Els nostres resultats posen de manifest que en distàncies interneurals llargues però no limitants per a la tubulització amb guies estàndar de silicona, la reparació per autoempelt de nervi ciàtic obté els millors resultats d'inici de la reinnervació i de recuperació funcional en les diferents proves estudiades i continua sent la reparació de referència (Müller et al 1987, Navarro i Kennedy 1991, Butí et al 1996, Rodríguez et al 1990a). Pel que fa a la recuperació de les funcions mediatas per fibres primes (sudoració, nocicepció) aquestes diferències no són tant acusades (Navarro i Kennedy 1991, Butí 1994, Butí et al 1996). Malgrat la seva superioritat com a mètode reparatiu en distàncies interneurals llargues, hi ha diversos factors que

poden condicionar i fer replantejar l'efectivitat de la reparació per empelt. En primer lloc obliga a un pas quirúrgic original i a l'extracció de segments de nervis de menor importància funcional, bàsicament sensorials, que tot i així comporten l'anestèsia de les regions denervades i riscos de dolors neuropàtics associats (Sunderland et al 1991, Omer et al 1998). En segon lloc, la seva eficàcia està limitada, amb marges òbviament molt més amplis que la tubulització, per la distància de resecció més que per la distància d'empelt interposada. Així, un estudi en primats demostra que un empelt múltiple de sural en una lesió ressectiva de 30 mm obté pitjors resultats que en una de 10 mm (Kim et al 1991). Els nostres resultats corroboren que els 8 mm de *gap* no són una distància limitant per a un autoempelt de ciàtic en la rata ni, malgrat el fracàs de regeneració en un animal del grup, per a la tubulització estàndar (Lundborg et al 1982b, Seckel et al 1984, Kim et al 1991). La col·locació d'un empelt genera al llarg del nervi dos fronts de sutura que poden generar dificultats als axons regenerants. Alguns estudis han observat fins i tot que s'obté pitjor recuperació funcional quan es repara una mateixa distància interneural amb empelts curts que llargs, donat que els punts de sutura se situen més pròxims i poden arribar a generar un reacció cicatricial conjunta més forta que obstaculitzi el creixement axonal (Kim et al 1991). Finalment, la dificultat d'obtenir un empelt de poca importància funcional que s'adapti a les característiques de l'extrem proximal, fa que en la majoria dels casos, donat que s'utilitzen empelts de petit diàmetre, el cirurgià està obligat a interposar per mitjà de múltiples sutures proximals i distals diversos segments d'injert. L'increment del número de sutures interposades, a més d'exigir al cirurgià una gran capacitat tècnica, augmenta el risc de reacció cicatricial i de fracàs de la reparació (Sunderland et al 1991). En aquest treball s'ha utilitzat un autoinjert del mateix segment de ciàtic ressecat, interposat mantenint la mateixa posició i orientació. Es tracta d'un empelt òptim o *ideal* impossible d'obtenir en situacions clíniques reals, que presenta a més tots els avantatges d'aquest tipus de reparació i cap dels seus inconvenients, fet que cal tenir en compte quan es comparen els seus bons resultats amb els de tècniques alternatives com la tubulització (Navarro i Kennedy 1991).

Estudis histològics demostren que després d'una secció nerviosa reparada per sutura o tubulització el nombre d'axons mielínics assoleix en 1-2 mesos el seu nivell original i finalment s'incrementa per damunt dels valors observats en nervis controls. Per altra banda, els axons amielínics presenten després de la lesió, un nivell inferior als mielínics i només al cap de més temps assoleixen nivells normals (Giannini et al 1989, Jenq i Coggeshall 1985). Al cap de nou mesos d'una lesió per compressió o una secció reparada per injert de nervi ciàtic, el nombre de fibres mielíniques i amielíniques és molt semblant al dels controls, però el diàmetre promig de les fibres regenerades mostra una disminució, més accentuada en el grup injertat (Giannini et al 1989). Aquestes dades contrasten amb els resultats de recuperació funcional després de seccions nervioses completes, les quals mai arriben a restituir, encara que es reparin, nivells de reinnervació normal (Butí et al 1996, Müller et al 1987, Navarro et al 1994b). Els estudis histològics del segment distal al punt de lesió del nervi regenerat no s'acostumen a correlacionar, en comparar grups sotmesos a lesions de diferents graus de severitat, amb els resultats de proves funcionals (Buehler et al 1990). Els comptatges de fibres acostumen a estar sobredimensionats pel fet que, fins i tot molt temps després

de la lesió, els axons regeneratius tenen més d'una branca distal (Horch i Lisney 1981, Jenq i Coggeshall 1985). Després de lesions severes amb pèrdua de continuïtat, els axons regeneratius tenen més probabilitats de créixer erròniament a través de tubs endoneurials diferents als originals, cap a òrgans diana equivocats que no aconseguiran reinervar, determinant un nivell de recuperació funcional inferior d'aquell que es podria extrapolar a partir del nombre d'axons regenerats distalment a la zona de lesió (Evans et al 1991, Molander i Aldskogius 1992, Myles et al 1992). Les deficiències funcionals també poden ser motivades pel funcionament anormal de les neurones regeneratives. Tal i com mostren els nostres resultats, els primers PAMC i PANC registrats presenten uns temps de latència molt llargs respecte dels preoperatoris, posant de manifest que, malgrat la seva funcionalitat, es tracta de fibres immadures i de baixa velocitat de conducció. Tres mesos després de la lesió el temps de latència encara es manté per sobre dels seus valors normals en tots els grups estudiats. Histològicament és característic que fins i tot molt de temps després de la lesió nerviosa, el diàmetre de les fibres tant mielíniques com amielíniques es mantingui per sota dels valors normals (Giannini et al 1989, Gómez et al 1996, Rodríguez et al 1999a).

La tubulització simple amb guies de silicona mostra un retard en l'inici de les respostes funcionals que per als paràmetres més distals mediat per fibres gruixudes es comencen a obtenir només al darrer dia de seguiment (90 dpo), al mateix temps que la regeneració fracassa en algun dels animals d'aquests grups. Si bé els 8 mm no són una distància limitant per a la tubulització amb determinats tipus de materials, sí que comença a posar en compromís la seva capacitat per reinervar adequadament les dianes corresponents. Els nostres resultats mostren que 2 dels 13 animals del grup SIL8 no presenten als 90 dpo reinervació detectable del múscul plantar; el *gap* de 8 mm reparat amb tub de silicona utilitzat en el nostre estudi mostra un èxit de reinervació (85%) superior al referit per Müller i col·laboradors (Müller et al 1987). En tot cas, l'efecte més important és la disminució de la quantitat de recuperació, fet que cal atribuir a la disminució d'axons capaços de regenerar en segments distals del nervi (Gómez et al 1996) o a la reinervació aberrant. En favor de la tubulització cal dir que s'està comparant els seus resultats amb els d'un empelt *ideal* com el del propi segment resecat. Si s'apliquen injerts de menor cal·libre, com és empeltar el segment de la branca del nervi peroneal (aproximadament un terç del calibre total del ciàtic) les diferències respecte a la tubulització es redueixen, donant nivells finals de reinervació similars (Butí 1994, Rodríguez et al 1999a).

L'excessiva rigidesa i la perennitat de la guia de silicona que pot generar dany axonal secundari per compressió mecànica sobre el nervi regenerat en creixement i la seva impermeabilitat que dificulta l'intercanvi metabòlic entre l'interior i l'exterior del tub, han promogut la recerca i l'experimentació de dissenys i sobretot materials que pugin optimitzar els resultats dels anomenats *injerts artificials* (Mackinnon i Dellon 1990, Madison et al 1986, Archibald et al 1995, Navarro et al 1996, Rodríguez et al 1999a, 1999b).

### 1.2.5. fascicular amb tubs de silicona en gaps llargs

La tubulització fascicular amb guies de silicona afegeix a les limitacions del grup anterior l'increment de volum i de rigidesa de la doble cambra tubular. El disseny de la guia consisteix en dos tubs adaptats a la mida dels fascicles tibial i peroneal units longitudinalment entre si. La mobilitat de l'extremitat a partir de la musculatura més proximal al punt de lesió denervada fa que en alguns dels animals s'hagi donat una dehiscència de les sutures que uneixen els fascicles a la seva cambra corresponent, de manera que els axons, especialment els del fascicle peroneal que per la seva trajectòria presenta més risc de tracció, han sortit de la cambra i han regenerat per fora d'aquesta. Alguns dels animals han convertit les seves lesions tubulitzades en lesions no reparades que en aquestes distàncies interneurals no permeten la reinnervació espontània de les seves dianes. No hi ha massa treballs que hagin estudiat l'efecte del disseny de les guies neurals fasciculars sobre l'èxit o fracàs de la regeneració. Els estudis que han utilitzat cambres de mides i disseny particulars com els tubs en Y per a estudiar l'especificitat fascicular (Politis et al 1985, Zhao et al 1992a) han estat fets tots ells a curt terme i descarten els casos amb fracàs. En tot cas, diversos treballs han demostrat que les característiques físiques de la guia neural juguen un paper important sobre el grau de regeneració axonal; particularment, tubs que tenen un excessiu gruix de paret i poca flexibilitat són susceptibles de dehiscència de sutura, limiten el nombre d'axons que hi poden regenerar, a més que poden generar complicacions secundàries de pèrdua d'axons i desmielinització degut a la compressió que exerceixen sobre el nervi regenerats (Henry et al 1985, LeBeau et al 1988, Merle et al 1989, Butí et al 1996, Den Dunnen et al 1995, Navarro et al 1996). La optimització del disseny en una única cambra cilíndrica amb dues llums interiors o bé la tubulització amb guies independents dels fascicles podrien possiblement millorar els resultats fins a fer-los equivalents als de la tubulització troncular amb silicona, tot millorant-ne la correspondència fascicular.

### 1.2.6. Tubulització amb guies de poli(L--lactat-co-ε-Caprolactona) en gaps llargs

Tot i que l'èxit de la reparació per tubulització és dependent de la distància interneural, la permeabilitat de la paret i la reabsorbibilitat de la guia emprada juga un paper important en la capacitat de promoure una regeneració ràpida a través de la cambra neural fins arribar al nervi distal. Els resultats aportats en aquesta memòria demostren que, en acord amb treballs ja publicats utilitzant com a model el ratolí (Navarro et al 1996, Rodríguez et al 1999b), les guies de PLC aconseguixen resultats de recuperació motora, sensorial i autonòmica millors que els dels tubs de silicona i no significativament diferents del grup reparat per autoinjert de nervi ciàtic, el model *ideal* d'empelt. Aquesta bona capacitat promotora de la regeneració converteix aquesta guia reparativa en una alternativa interessant a la reparació clàssica per injert (Den Dunnen et al 1995, Navarro et al 1996, Rodríguez et al 1999b). Si bé els tubs impermeables i permanents com la silicona poden resultar una bona alternativa terapèutica en *gaps* curts, on la formació d'una matriu connectiva inicial és satisfactòria (Navarro et al 1994b, Butí et al 1996, Lundborg et al 1997), en *gaps* llargs resulten poc o gens efectius. La guia neural ideal ha de: garantir una efectivitat igual o semblant a la del injert autòleg, ser biocompatible i generar una mínima reacció a cos estrany, ser biodegradable a una taxa de degradació lenta que assegurí el pas dels axons fins a l'extrem nerviós distal abans de la seva

reabsorció total, no tenir efectes neurotòxics ni com a estructura intacta ni a través dels seus productes de degradació, ser flexible especialment si se situa en zones mòvils com les extremitats, i en darrer lloc, que presenti unes característiques i propietats físiques que s'adaptin al nervi a reparar i permetin una implantació senzilla (Henry et al 1985, Fields et al 1988, Navarro et al 1996). El tub de PLC d'alta permeabilitat aconsegueix adequadament aquestes característiques en front de les tradicionals guies permanents no reabsorbibles, de silicona, teflon o altres plàstics. La utilització de materials biològics com el polilactat o el col·lagen afavoreix la integració en els teixits de l'hoste i accelera la vascularització. A més, el fet que la guia de PLC emprada tingui una alta permeabilitat de paret afavoreix la formació del cordó inicial de fibrina i permet la infiltració de macròfags i fibroblasts, que col·laboren en la formació del cordó cel·lular. Sembla que aquestes cèl·lules també participarien en la dinàmica de degradació del tub (Archibald et al 1991). La degradació relativament lenta (5-6 mesos) de la guia de PLC emprada (Perego et al 1994) està sincronitzada al procés de creixement i maduració del nervi regeneratiu, de tal manera que a mesura que aquest creix en diàmetre, va desapareixent la paret tubular, evitant fenòmens compressius posteriors. Per altra banda, la guia manté la seva estabilitat i integritat durant un període suficient de temps com per garantir el pas dels axons a través de la seva llum i la formació d'una barrera hematoneural a l'entorn del nervi (Azzam et al 1991). Guies neurals que per a *gaps* mitjos o llargs tenen una taxa de reabsorció massa ràpida exposen el cordó regeneratiu al medi extracel·lular i poden afectar a la regeneració (Aebischer et al 1989).

### 1.3. Capacitats regeneratives de diferents tipus de fibres nervioses

Els nostres experiments posen de manifest, d'acord amb observacions prèvies en lesions del nervi ciàtic del ratolí (Navarro i Kennedy 1991, Navarro et al 1994b, Verdú et al 1995, Labrador et al 1998, Rodríguez et al 1999a, 1999b), que les fibres nervioses primes, sudomotores i nociceptives, reinnerven lleugerament abans les seves dianes distals i assoleixen nivells funcionals notablement més elevats que els aconseguits per fibres motores i sensorials gruixudes en cadascun dels grups experimentals. Aquestes diferències es fan més marcades a mesura que s'incrementa la severitat de la lesió infringida, mentre que en lesions lleus o amb mètodes reparatius molt efectius pot quedar enmascarada per la bona evolució general de tota mena d'axons. Les nostres dades mostren que al grup de compressió hi ha diferències entre la recuperació de les funcions nociceptives i motores, però no entre aquestes primeres i la recuperació dels PANCs sensorials, mentre que en la resta de grups de secció i resecció, s'observen també diferències en l'amplitud de resposta i la proporció d'animals amb recuperació entre la reinnervació mediada per axons motors (m. plantar) i sensorials gruixuts (nervis digitals). En termes globals, les fibres nociceptives són les que assoleixen nivells més elevats, seguides a certa distància per les sudomotores, les fibres motores i finalment les fibres sensorials gruixudes. Així doncs, sembla que els axons de petit diàmetre tenen menys dificultat per travessar la zona de lesió i presenten una velocitat regenerativa més ràpida que les fibres gruixudes. Aquestes capacitats regeneratives particulars segons el gruix de la fibra nerviosa es poden explicar per diferències en la capacitat d'emetre branques col·laterals, la velocitat d'elongació, la major o

menor dificultat segons diàmetre per travessar regions on s'ha produït una reacció cicatricial, i finalment, donat que s'està avaluant en la majoria de proves la resposta de l'òrgan diana, la capacitat i el temps necessari per construir sinapsis funcionals.

Estudis electrofisiològics directes sobre el nervi demostraren que, després d'una lesió per compressió, les fibres mielíniques primes regeneren més ràpidament que les gruixudes (Karup i Loeb 1988). Contràriament, treballs anteriors basats en la recuperació de respostes funcionals en l'animal íntegre en les proves del *pin prick* i el *toe spreading*, van calcular que la velocitat de regeneració era lleugerament més ràpida en axons nociceptius (3,35 mm/dia) que en motors (2,77 mm/dia) (Gutmann 1942, Gutmann i Guttmann 1942). Els temps transcorregut fins a la detecció de reinnervació perifèrica depèn tant de la velocitat de regeneració axonal com del temps implicat en l'establiment de sinapsis amb estructures diana. Els axons motors que regeneren entre 3-4 mm/dia després d'una compressió, en arribar a les proximitats de la placa neuromuscular redueixen dràsticament la velocitat fins a només 1µm/dia a la fenadura sinàptica (Gorio et al 1983). S'ha comprovat que l'estimulació nerviosa és capaç d'evocar la contracció muscular 24 hores després de produir-se el contacte axó-cèl·lula muscular (Carmignoto et al 1983), mentre que les respostes nociceptives apareixen simultàniament a la detecció histològica de fibres a nivell de la pell denervada (Nixon et al 1984, Verdú i Navarro 1997). Per mitjà de tècniques immunohistoquímiques i neurofisiològiques s'ha demostrat que, mentre els primers perfils nerviosos marcats amb PGP 9.5 fan la seva aparició en estructures de la planta de la pota a partir dels 16 dies poscompressió del nervi ciàtic, la resposta funcional es detecta a l'entorn dels 17 dies en receptors nociceptius, 16 dies en glàndules sudorípares i als 19 dies en músculs plantars, amb certes diferències en l'interval de temps dedicat pels tipus de fibres nervioses a la reconexió funcional (Verdú i Navarro 1997). El nostre seguiment mensual no és probablement prou detallat per establir amb exactitud canvis del dia d'aparició de la resposta segons diferents funcions, encara que sí que permet constatar en grups de lesions de resecció un ordre de recuperació de la resposta segons el diàmetre de fibres nervioses que permeten la funció (nociceptiu, sudomotor, motor i sensorial).

En referència a la major recuperació final de les funcions mediades per fibres primes que gruixudes, alguns treballs histològics que han analitzat seccions transversals de nervis regenerat en punts proximals, mitjos i distals, no han trobat evidències clares que les fibres mielíniques regenerin pitjor que les amielíniques (Giannini et al 1989). De fet, després d'una lesió nerviosa en animals madurs com els utilitzats es produeix un índex de mort significativament superior de neurones sensorials de petit tamany una gran majoria de les quals envien axons de fibres Aδ i C que de motoneurones i neurones sensorials de gran diàmetre amb d'axons mielínics (Melville et al 1989, Groves et al 1997, Govrin Lippmann 1979). De manera aparentment paradoxal, sembla que la relació quantitativa a nivell perifèric entre fibres mielíniques i amielíniques s'incrementa després d'una secció nerviosa (Carter i Lisney 1991, Jenq i Coggeshall 1985) fet que s'explica per la gran capacitat de les neurones de petit diàmetre i axons amielínics o mielínics prims d'emetre col·laterals terminals superant els límits establerts pels dermatomes corporals. La pèrdua de neurones per apoptosi es compensa

parcialment per una optimització dels pocs recursos cel·lulars existents, de manera que amb l'emissió de branques terminals s'intenta cobrir la màxima extensió de territori. Així, mentre els primers ramifiquen profusament a l'extrem nerviós distal, els axons mielínics motors o sensorials solen aturar el seu creixement (Jenq i Coggeshall 1985). Quan el procés regeneratiu es troba ja en fase d'estabilització, la proporció de fibres mielíniques i amielíniques torna a proporcions similars les normals (Lisney 1987).

La major recuperació de les funcions sudomotora i nociceptiva per fibres primes en relació a la reinnervació muscular i la regeneració de fibres gruixudes no és explicable només per la seva velocitat d'elongació superior, per una major supervivència a la lesió o pel fet que regenerin en major nombre. Les fibres sensorials primes mostren una elevada capacitat de col·lateralitzar distalment i penetrar en teixits diana que no respecta l'organització territorial, aconseguint un increment dels perfils nerviosos i del nombre de cèl·lules sinaptades per cada axó regeneratiu (Orgel et al 1972). Després d'una lesió nerviosa es produeix una elevada ramificació col·lateral i terminal de les fibres nervioses regenerades que incrementa per igual el nombre de perfils mielínics i amielínics i s'extén per una superfície cutània superior a l'original (Kinnman i Aldskogius 1986, Kinnman et al 1992). Ara bé, la capacitat de les branques col·laterals per aconseguir una reinnervació funcional fora dels seus límits és quasi exclusiva de les fibres primes, de manera que després d'una secció nerviosa reparada per sutura s'observa una expansió funcional de terminacions lliures que actuen com a nociceptors polimodals i per contra, escasses modificacions dels territoris de mecanoreceptors de baix lllindar reinnervats per fibres gruixudes (Devor et al 1979, Povlsen et al 1993, Wiesenfield-Hallin et al 1989). Els axons sudomotors amielínics també tenen una elevada capacitat de col·lateralitzar després de diferents tipus de lesions, reinnervant territoris més amplis que els originals i aconseguint nivells de recuperació molt elevats (Navarro et al 1988, Navarro et al 1994b). Els nostres resultats mostren però, que la recuperació de la funció sudomotora apareix més tardanament que per a fibres nociceptives degut probablement al fet que mentre les primeres s'estableixen com a terminacions lliures epidèrmiques les segones requereixen un cert temps per a establir sinapsis amb la glàndula denervada i activar els receptors muscarínics desensibilitzats per la denervació (Cannon 1939). A més, tal i com es demostra en aquesta memòria, la majoria de les GS estan poliinnervades per més d'una terminal axònica de tal manera que per a l'activació de l'òrgan diana és probable que sigui necessària l'estimulació simultània per diferents fibres. La capacitat de col·lateralització de fibres amotors és molt més reduïda i queda limitada a zones properes dels músculs que innerven, sense envair estructures adjacents (Thomson i Jansen 1977, Brown et al 1980). Encara que la restricció de col·lateralitzar a territoris adjacents desapareix parcialment en axons regeneratius i aquests són capaços de reinnervar un major nombre de fibres musculars, però limitat al mateix múscul (Gutmann i Young 1944, Henneman i Olson 1965, Gordon et al 1991). Les fibres sensorials gruixudes mostren en els nostres resultats una recuperació més tardana i inferior a la motora. Donat que la seva recuperació es registra per mitjà del PANCs sobre els nervis digitals, no hi contribueix cap retard per establir sinapsis amb dianes perifèriques, que les motoneurons sí han d'establir amb les fibres musculars. D'una banda la menor sensibilitat dels registres sobre nervis petits amb nivells inicials de

regeneració i el fet que el registre es realitzi en la part més distal de l'extremitat, explicarien aquestes diferències.

L'elevada capacitat de regeneració i de col·lateralització de fibres nervioses primes, especialment les nociceptives, no resulten sensibles com a mesures per a discriminar l'eficàcia de procediments reparatius, reduint-se les diferències entre grups. Així en situacions on les diferències entre grups siguin estretes i es pretengui quantificar la capacitat regenerativa global és més recomanable utilitzar funcions mediades per fibres mielíniques gruixudes, mentre que en lesions severes les funcions mediades per tots tipus de fibres poden detectar diferències. Les diferents capacitats regeneratives entre fibres primes i gruixudes estarien relacionades amb la funció a la qual cadascuna d'elles està destinada. Així, una elevada capacitat de col·lateralització i extensió territorial d'axons motors i de fibres de mecanoreceptors de baix llindar podria produir alteracions de la coordinació motora i la pèrdua de l'organització espacial necessària per discriminar adequadament la localització d'estímuls tàctils. De manera oposada, en axons destinats a la detecció d'estímuls potencialment perillosos (fibres nociceptives) o a la termoregulació (fibres sudomotores), funcions per a les quals la precisió topogràfica és menys important que la possibilitat de cobrir un territori ampli amb la dotació cel·lular sobrevivent després de la lesió, la capacitat de projecció a territoris veïns denervats té una major utilitat funcional.

## 2. Recuperació de la funció de locomoció

La consecució de bons nivells finals de recuperació dels paràmetres histològics i electrofisiològics que avaluen la regeneració i la reinnervació per part de diferents tipus de fibres nervioses després de lesions, com els estudiats en aquesta memòria (activitat muscular, potencials sensorials, sensibilitat nociptiva i activitat sudomotora) no sempre garanteixen el restabliment de la funció global que han de portar a terme. La prova que en darrera instància és més indicatiu de la recuperació postlesiva és aquella que valora la restitució de funcions globals i la integració de la reinnervació funcional dels diferents tipus de fibres (De Medinaceli et al 1982, Brown et al 1991, Dellon i Mackinnon 1989). S'ha volgut analitzar la recuperació d'una de les funcions en les quals el nervi ciàtic està implicat, com a tronc nerviós que innerva la musculatura flexora i extensora del peu de l'extremitat posterior. S'ha avaluat el patró de locomoció dels subjectes experimentals en condicions fisiològiques, i s'ha quantificat en funció de les característiques de les petjades efectuades durant un trajecte (De Medinaceli et al 1982). El grau de reinnervació muscular i sensorial distal, però també la qualitat de la reinnervació (Sumner 1990), la concordança entre les projeccions eferents i les aferències espinals (Koerber et al 1995, 1996) i la correcció de la integració sensòrio-motora són alguns dels elements fonamentals que fan possible que després de lesions la regeneració permeti una adequada recuperació funcional.

Amb la denervació, s'observa un allargament inicial de la distància goblal de la petjada (PL) per la impossibilitat d'aixecar el taló i un escurçament de les distàncies entre el 1r i el 5è dit (TS) i el 2n i el 4t dit (IT) degut a la dificultat per separar els dits. Als 90 dies de seguiment, el grup de compressió recupera la capacitat de flexió-extensió del taló i d'extensió dels dits fins a valors equivalents als seus propis nivells preoperatoris. La resta de grups mostren una lleugeríssima tendència a la recuperació fins a valors significativament inferiors als seus mateixos preoperatoris i als del grup control. El grup de secció i sutura epineural és l'únic que mostra entre tots ells, una apreciable tendència a la millora, sense que al final aconsegueixi establir diferències significatives amb la resta de grups. Dels tres paràmetres avaluats el que discrimina millor entre grups amb diferent grau de recuperació és el que avalua la capacitat d'extensió màxima digital (TS), mentre que la resta mostren diferències intergrupals menors. Paradoxalment, grups que mostren diferències respecte al percentatge de funcions mediades per fibres gruixudes (motores i sensorials) no presenten diferències en la recuperació de la funció locomotora global.

### 2.1. Avaluació del patró de locomoció: walking track

L'establiment de tècniques d'avaluació quantitatives de funcions globals presenta moltes més dificultats en animals d'experimentació que en humans (Guth 1956). D'una banda, l'avaluació de la funció sensorial és imprecisa per la sobreposició de territoris i obliga en models experimentals a mesures indirectes (Devor et al 1979, Gutmann i Guttmann 1942). La recuperació motora, malgrat que acostuma a ser més tardana que la nociptiva, permet estudiar funcions globals en alguns casos

de manera més reproduïble (Mayer i Denny Brown 1964). Gutmann (1942) va demostrar en conills que la resposta de separació dels dits (*toe spreading*) era indicativa de la funció del nervi peroneal. Aquest signe, però, de la mateixa manera que l'estimació de la petjada per caiguda (*foot drop*) presenta una dificultat intrínseca de quantificació i una baixa reproducibilitat (Gutmann 1942, Gutmann i Guttman 1942, Bain et al 1988, Brown et al 1991, Dellon i Dellon 1991). Al mateix temps, una gran majoria de proves com les esmentades avaluen conductes en les quals el nervi es troba implicat en una reacció motora reflexa que es desencadena en condicions inhabituals i es caracteritza per la seva simplicitat. Se sap que per un rang ampli de velocitats de desplaçament, pes i edat del subjecte experimental, el patró de locomoció dels rossegadors és consistent i reproduïble (Hrushka et al 1979) i per tant subjecte de quantificació. Es considera que la rata camina sense alteracions espacials o temporals quan es desplaça a una velocitat d'entre 20 i 80 cm/s. En aquesta situació, les quatre potes mostren patrons similars i de contacte amb la superfície de desplaçament. Com més ràpida es fa la locomoció, més curta és la fase de contacte i la longitud del pas mentre que la fase d'alçada sembla que no s'afecta pel canvi de velocitat (Hruska et al 1979, Walker et al 1994). Les lesions del nervi ciàtic determinen la denervació de l'extremitat posterior de l'animal i produeixen tant per la denervació muscular derivada de la lesió d'axons motors com per la pèrdua d'aferències sensorials tàctils i propioceptives, una alteració del patró de deambulació. Així la reinnervació muscular i sensorial hauria de plasmar-se també en una normalització del patró de locomoció després de lesions.

De Medinaceli i col·laboradors (1982) van desenvolupar un mètode adequat per avaluar les variacions del patró de marxa d'animals rossegadors afectats per lesions traumàtiques dels nervis de l'extremitat posterior, per mitjà de l'enregistrament de les petjades produïdes per l'animal en caminar per un passadís allargat. La distància entre la base del turmell i la punta dels dits (PL), determinada per l'activitat de la musculatura flexora del peu innervada pel fascicle tibial s'incrementa després de la lesió. Per altra banda, la distància de separació entre la punta dels dits (TS i IT), que depèn de músculs intrínsecs i extensors del peu innervats pel fascicle peroneal, disminueix amb la denervació. L'estudi de Bain i col·laboradors (1989) va definir amb claredat les posicions relatives d'extensió-flexió dels dits i la pota de l'animal després de lesions selectives. La lesió única del fascicle peroneal denerva els músculs extensors dels dits, els extensors i rotadors interns del peu. Per això, donat el predomini dels flexors dels dits i els flexors plantars i la reducció de la dorsiflexió al turmell, l'animal escurça el PL i el TS i IT de la seva petjada. El patró de locomoció d'aquests subjectes és relativament normal i difícil de diferenciar dels animals sans. La lesió selectiva del nervi tibial produeix la denervació de músculs flexors plantars (gastrocnemi), els flexors dels dits, els intrínsecs del peu (múscul plantar) i el pronador lateral del peu, expressant-se en un increment del PL, agreujat encara més pel predomini dels flexors dorsals, una reducció del TS i l'IT i una tendència a l'eversió del peu que fa que caminin recolzant o arrossegant la superfície dorsal sobre el sòl. La lesió completa del ciàtic produeix un patró similar al de la lesió tibial però sense els efectes del predomini de grups d'antagonistes dels músculs flexors dorsals del peu, de manera que s'incrementa el PL i es redueix el TS i l'IT sense que s'observi una tendència a l'eversió. La lesió concomitant del peroneal dona lloc a

una marxa més inestable, en la qual es produeixen sovint arrossegaments i rellicades del peu (Bain et al 1989). Alguns autors han proposat la quantificació adicional d'altres paràmetres, com l'angle de petjada respecte a l'eix longitudinal del moviment (Klapdorp et al 1997) i la distància fins a la petjada següent (TOF, *distance to opposite foot*) que avalua la capacitat de l'animal per suportar el seu pes amb la força de l'extremitat posterior i anterior en contacte amb el sòl (De Medinaceli et al 1982). El TOF s'escurça durant la locomoció i tendeix a recuperar-se amb la reinnervació (De Medinaceli et al 1982) però de la mateixa manera que l'angle de la petjada, no s'han considerat en el nostre estudi perquè només PL, TS i IT aconsegueixen la doble condició de no presentar diferències entre registres de potes no operades i de presentar diferències significatives entre potes normals i denervades (Bain et al 1989). Diferents sistemes han estat utilitzats per registrar les empremtes de les potes de l'animal: revelador sobre pel·lícula radiogràfica (De Medinaceli et al 1982, Hare et al 1992, Dellon i Mackinnon 1989, Dellon i Dellon 1991, Brown et al 1989, Bain et al 1989), tinta sobre paper (Hruska et al 1979), bromofenol amb aigua (Shenag et al 1989), grabació videogràfica (Walker et al 1994) o simplement pintura sobre paper (Ben Johnston et al 1991, Klapdorp 1995), mètode pel qual s'ha optat en aquest treball, per la seva senzillesa i no toxicitat.

La majoria d'autors han conjugat els tres paràmetres bàsics de l'empremta de la petjada (PL, TS i IT) en un índex de recuperació funcional (IFC), compostat per la suma d'un factor per cadascun dels paràmetres consistent en la diferència de distàncies entre la pota sana i l'operada dividida pel valor de la pota sana (De Medinaceli et al 1982, Bain et al 1989). La fórmula considera que la contribució de cada factor al resultat final és equivalent, per això se sumen aritmèticament i el resultat es multiplica per un factor arbitrari que situa el rang de valors entre 0% per animals controls i -100% per la denervació. Els canvis observats presenten una bona especificitat segons el tipus de lesió produïda i les branques afectades del nervi ciàtic, i proposen fórmules que avaluin la recuperació específica de cadascuna d'aquestes per mitjà de factors de correcció que incrementen o redueixen el pes dels factors considerats en l'índex, definint així índexos de recuperació ciàtic, tibial i peroneal (Bain et al 1989, Hare et al 1992). Per aquesta raó, s'han generat índexos funcionals globals del ciàtic (Carlton i Goldberg 1986) o específics dels seus fascicles tibial i peroneal que consideren les aportacions relatives del peroneal i del fascicle tibial a la morfologia de la petjada durant la fase de contacte amb la superfície de desplaçament (Bain et al 1989). L'anàlisi dels paràmetres del *walking track* realitzats de manera periòdica al llarg del seguiment postoperatori és un mètode fiable per mesurar de manera no invasiva la recuperació global de la marxa després de lesions nervioses (Bain et al 1988, Brown et al 1991). A més, també s'ha utilitzat per estudiar canvis de l'activitat locomotora amb l'envelliment (Spengler et al 1995, Klapdorp et al 1997), l'entrenament físic (Dorner et al 1996), l'efecte de fàrmacs (Schuurmann et al 1987), l'efecte de lesions medul·lars (Bregman et al 1995), neuropaties perifèriques (Wiethölter et al 1990, Dellon i Dellon 1991) i alteracions de la conducta en ambients estranys (Rushton et al 1962). Per altra banda, les variacions del tamany de la pota amb l'edat, que comporta un lleuger increment de les mesures de la petjada, obliga a comparar quan s'efectua un seguiment al llarg de mesos, per cada dia d'avaluació els valors obtinguts de la pota

intervinguda amb la control contralateral o a integrar-les en índexs funcionals que estableixin la comparació entre l'extremitat sana i la lesionada.

El seguiment d'un grup de 17 animals control efectuat al llarg de 90 dies demostra la fiabilitat i reproducibilitat d'aquesta prova. Tant el PL (94-100%), com el TS (98-103%) i l'IT (93-103%) mantenen valors molt semblants als originals amb errors estàndar inferiors al 4%. El càlcul de l'índex funcional del ciàtic (IFC) que relaciona conjuntament els valors de PL, TS i IT de la pota operada amb els de la sana contralateral incrementa una mica la variabilitat (entre -1,7 i 8%), donat que afegeix a l'anterior la de la pota contralateral i a més fa una suma ponderada dels valors i de les dispersions de cada factor. La variabilitat entre observadors en la mesura dels registres de PL, TS i IT és reduïda, amb una diferència mitjana màxima ha estat determinada per diversos treballs al·entorn d'un 11% entre les distàncies mesurades, mentre que la variabilitat intragrupal en dues mesures dels mateixos animals fetes en moments diferents no excedeix en aquests mateixos treballs el 10% (De Medinaceli et al 1982, Brown et al 1991, Hare et al 1992). La variabilitat de l'avaluació periòdica dels mateixos animals pel mateix observador dona en el nostre cas valors inferiors als referits doncs per aquests estudis. De fet els límits de normalitat de l'IFC se situen entre -11% i +11% en animals controls (De Medinaceli et al 1982).

## 2.2. Recuperació després de lesions

En acord amb els nostres resultats, treballs previs que comparen la recuperació de l'activitat locomotora després de diferents tipus de lesions del nervi ciàtic assenyalen que aquesta depèn de la severitat de la lesió. Els animals sotmesos a seccions o reseccions nervioses mostren nivells de recuperació molt inferiors als afectats per una lesió compressiva (De Medinaceli et al 1982, 1988, Gibson et al 1991, Hare et al 1992). El nivell de recuperació dels diferents paràmetres del *walking track* així com de l'IFC no permet discriminar en el nostre treball entre lesions de secció i resecció ni entre els procediments reparatius assajats. Tot i que els grups amb secció del nervi mostren valors lleugerament més propers als preoperatoris, no es troben diferències significatives entre grups de secció i/o resecció al final del seguiment (De Medinaceli 1988). En canvi, sí que es pot observar que l'evolució de la recuperació en els grups de resecció presenta una dinàmica més retardada que la dels primers. Així als 30 i 60 dpo es troben algunes diferències significatives, que a mesura que té lloc la reinnervació distal es van diluint. El paràmetre PL és el que mostra al final del seguiment més significativitat entre diferents tipus de lesió i determinades reparacions. Si tenim en compte que el PL representa un fort component del nervi tibial i de la seva musculatura proximal, mentre que el TS i l'IT depenen més del nervi peroneal i de músculs distals, sembla que el nivell de recuperació funcional atribuïble al nervi tibial és superior en tots els grups encara que com menys severa és la lesió menys difereixen entre si. Aquestes dades concorden amb els resultats del seguiment electrofisiològic de la reinnervació muscular, segons el qual la reinnervació del múscul gastrocnemi assolix valors sempre superiors als del tibial anterior.

### 2.2.1. Lesions de compressió

En acord amb els nostres resultats, diversos autors han demostrat que, després de lesions de compressió del nervi ciàtic de la rata, l'IFC es recupera a nivells semblants (-11%) encara que significativament inferiors als preoperatoris als 30 dies de la lesió (De Medinaceli et al 1982, De Medinaceli 1988). S'ha observat l'inici de recuperació després de compressió a partir dels 18 dpo i nivells de recuperació màxims equivalents als preoperatoris de l'IFC als 45 dies de l'ordre de -10% (Hare et al 1992, Walker et al 1995). Més discrepàncies es troben en els nivells mínims de l'IFC assolits per la denervació, a partir dels quals es comença a produir la recuperació i que tenen a veure amb el primer dia postlesió avaluat. De fet, la inactivitat muscular redueix el TS i l'IT a un mínim definit pel gruix dels propis dits, mentre que el PL s'allarga fins a un màxim que depèn de la longitud total de la planta. Alguns autors troben valors de l'IFC de -125% als 2 dpo i de -100% als 7 dpo (De Medinaceli et al 1982, De Medinaceli 1988), mentre que per altres els mínims assolits són d'entre -80 i -90% als 3 i 10 dies de la lesió (Evans et al 1991, Hare et al 1992, Walker et al 1994). Crida l'atenció que tan l'IFC com el PL i el TS mostren al grup de compressió valors mínims durant la denervació immediata (2-7 dies) superiors als de la resta de grups experimentals (De Medinaceli et al 1982, Evans et al 1991, Hare et al 1992). En el nostre cas el grup de compressió mostra als 7 dpo valors mínims de l'IFC de -90% i al final del seguiment de -4%, significativament inferiors als del grup control encara que en termes absoluts les diferències siguin mínimes. L'evolució de paràmetres aïllats (PL, TS i IT) segueix una corba de recuperació paral·lela a la de l'IFC. Les dades indiquen que als 30 dies el grup de compressió mostra ja innervació de la musculatura proximal i, per aquesta raó, els valors de PL, TS, IT i IFC mostren valors més semblants als controls que la resta de grups. És una assumpció generalitzada que la recuperació d'un patró de marxa semblant a l'original només té lloc després de lesions compressives (De Medinaceli et al 1982, De Medinaceli 1988, Dellon i Dellon 1991, Walker et al 1994) i està afavorit per la gran especificitat de la reinnervació muscular i sensorial perifèrica.

### 2.2.2. Lesions de secció

La reparació de les lesions de grau V de Sunderland condiciona les possibilitats de recuperació del patró de marxa. Diversos autors han provat que lesions de secció o resecció no reparades mostren absència de recuperació de l'IFC fins a 13 mesos posteriors a la lesió (Shenaq et al 1989, Gibson et al 1991, Hare et al 1992). Dades, no mostrades en aquest treball, d'alguns animals lesionats seguits durant 6 mesos, demostren que als 90-120 dies els animals assoleixen la seva màxima recuperació de l'IFC i ja no tendeixen a millorar més, en acord amb d'altres autors (Hare et al 1992). La secció troncular del ciàtic reparada per sutura directa dels seus extrems presenta, segons els estudis, millores insignificants de l'IFC que es manté quasibé estable amb valors a l'entorn del -100% (De Medinaceli et al 1982), una lleugera millora de l'IFC fins a valors de -60% (Hare et al 1992), o una recuperació apreciable de l'IFC fins a -40% (Evans et al 1991). En acord amb les nostres dades, Evans i col·laboradors (1991) han demostrat que diferents mètodes reparatius aplicats sobre una secció nerviosa com la sutura epineurial alineada i la tubulització amb silicona, si bé mostren diferents nivells d'especificitat funcional de la reinnervació, no manifesten diferències significatives

dels nivells finals de l'IFC (Gibson et al 1991, Evans et al 1992). Per explicar aquesta escassa recuperació funcional global, diversos autors han demostrat en estdis en paral·lel que entre 3 i 4 mesos després de seccions reparades del ciàtic, s'observen alteracions del patró temporal de reclutament de la musculatura flexora i extensora, que es coactiven parcialment bloquejant el moviment de flexo-extensió durant la deambulació (Gordon et al 1980, 1985, Wasserschaff 1990).

En el nostre treball, el grup amb una sutura epineurial creuada dels fascicles tibial-peroneal presenta valors de recuperació de l'IFC i dels paràmetres PL, TS i IT inferiors als del grup amb sutura correcta i equivalents als del grup de tubulització i a la resta de grups de resecció. Altres treballs han assenyalat que la sutura epineurial creuada o les reseccions generen alteracions tan importants sobre el patró de deambulació que els fa immesurables (Shenaq et al 1989, Evans et al 1991). En lesions aïllades de fascicles del nervi ciàtic o en graus molt diferents de reinnervació de musculatura flexora i extensora, el predomini del to muscular de les dianes no denervades o millor reinnervades pot produir la fixació de les articulacions en posicions estranyes (Hare et al 1992). Diversos autors han destacat la presència de contractures i anquilosi articular en la majoria d'animals sotmesos a seccions no reparades o sutures mal alineades (Dellon i Mackinnon 1989, Evans et al 1991, Hare et al 1992). Les nostres observacions han detectat en la majoria d'animals del grup de sutura creuada, moviments molt exagerats d'elevació de la pota posterior amb hiperextensió de l'extremitat durant la fase d'alçada de la marxa, degut probablement a contractures musculars i a la coactivació de musculatura flexora i extensora del peu que podria afectar la fase de contacte, produint el seu arrossegament. En tot cas i a diferència d'altres autors amb criteris aparentment més estrictes (Evans et al 1991, Dellon i Mackinnon 1989) això no ha impedit en la majoria dels casos registrar les característiques principals de la petjada d'aquests animals. Les contractures, la coactivació muscular i altres alteracions no inhabiliten la mesura de la deambulació. En aquesta casos les proves reflecteixen la qualitat de la innervació i les seves dades resulten des del punt de vista de la funció global igualment útils.

### 2.2.3. Lesions de resecció

En acord amb la majoria d'autors, el nostre treball demostra que la resecció, independentment del mètode reparatiu emprat i malgrat els elevats nivells de reinnervació muscular i sensorial, no aconsegueix recuperar durant la locomoció la capacitat d'extensió dels dits i la flexo-extensió de l'articulació del turmell (Shenaq et al 1989, Evans et al 1991, Gibson et al 1991). S'han realitzat estudis en distàncies interneurals curtes (4 mm) intermitges (8 mm) i llargues (10 mm) en el nervi ciàtic de la rata, reparades per empelt o tubulització. L'IFC en lesions resectives de 4 mm o 8 mm assoleix valors mínims als 7 dies entre -95 i -100%, mentre que als 90 dpo arriben només a millorar fins a valors entre -73 i -70%. Altres autors han trobat en *gaps* curts (4 mm) en la rata nivells mínims de l'IFC de l'ordre de -110% i màxims de recuperació als 90 dpo de -45%, superiors als dels nostres resultats (Evans et al 1991). Aquest mateix treball demostra que canvis en l'alineament relatiu dels fascicles peroneal i tibial entre l'extrem proximal i distal no modifiquen el grau de reinnervació específica i aberrant muscular ni la millora del patró de deambulació. En distàncies

interneurals de 5 mm en la rata, reparades per tubulització amb guies de silicona, vicril, marlex o per un autoinjert de ciàtic no es troben diferències en cap moment del seguiment entre diferents procediments reparatius, i en tots els casos, malgrat que TS i IT mostren al llarg del temps canvis significatius, els valors finals de PL, TS, IT i IFC estan molt allunyats dels preoperatoris (Gibson et al 1991). En distàncies interneurals llargues, de 10 mm, cap dels procediments habituals de reparació (autoempelt de ciàtic o tubulització amb guia de silicona) aconsegueix tampoc canvis substancials de l'IFC al llarg de 17 setmanes de seguiment (Shenaq et al 1989). En el nostre treball, el grup d'autoempelt presenta una recuperació de les distàncies PL i IT superior a la resta de grups de secció i resecció, però els seus valors de IFC no són significativament diferents, fet que indica que en el context global de tots els paràmetres, aquest possible efecte avantatjós de l'empelt queda diluït. També cal destacar que el grup de tubulització fascicular recupera de manera preeminent i amb valors superiors als de la majoria de grups de secció i resecció el paràmetre PL. La tubulització fascicular és un tipus de reparació que per l'elevat volum de la guia limita el nivell de reinnervació, però genera una gran especificitat de la reinnervació. En aquest cas, el fascicle tibial, ha reinnervat adequadament les seves dianes i ha compensat parcialment la pèrdua de "quantitat" d'innervació. En acord doncs amb els nostres resultats, grups de subjectes amb una bona reinnervació perifèrica després de reseccions gràcies a un mètode reparatiu eficaç, no presenten diferències en la recuperació de la funció global.

### 2.3. Utilitat del walking track com a prova d'avaluació global

La prova del *walking track* ha estat criticada per no reflectir els esdeveniments de la regeneració i la reinnervació, per als quals ha estat emprada. Diferents treballs han posat de manifest les discrepàncies existents entre les dades electrofisiològiques (amplitud dels PAMC i PANC), histològiques (recompte del nombre d'axons i dels seus diàmetres) i els resultats de la prova de deambulació o *walking track*, que indica una recuperació mínima o inexistent del patró de marxa original en contradicció amb la resta de proves (Shenaq et al 1989, Gibson et al 1991, Evans et al 1991, Hare et al 1992). El nostre treball demostra que nivells elevats de recuperació histològica i/o funcional de la reinnervació de dianes no necessàriament garantitzen la recuperació de la funció en la qual participen, ni tampoc que diferències significatives en la reinnervació avaluada per aquests mètodes per procediments reparatius diferents es plasmin en millores diferencials de la funció global de marxa. Dificultats per reproduir una conducta de deambulació a velocitats similar en animals diferents (Hruska et al 1979), l'efecte distorsionador de la difusió radial de la pintura utilitzada per registrar les petjades (Ben Johnston et al 1991, Klapdorp et al 1995), les contractures intrínseques postdenervació, l'alteració dels registres per l'augment de longitud de les ungles dels animals a l'extremitat denervada (Dellon i Mackinnon 1989), la possible anquilosi articular del turmell i posicions lateralitzades o invertides de la planta per desequilibris en el to muscular (Dellon i Mackinnon 1989, Brown et al 1989, Hare et al 1992, Shenaq et al 1992), la manca de validesa de la comparació entre paràmetres de les potes dretes i esquerres per l'efecte compensador de la pota contralateral a la denervada, l'efecte distorsionador del pes dels animals que per damunt de 350 gr

incrementen respecte als controls els valors del TS, IT i el PL (Dellon i Dellon 1991); han estat les raons utilitzades per justificar la manca de validesa d'aquesta prova en front a les tècniques d'avaluació electrofisiològica i histològica. Els coeficients de correlació entre les dades obtingudes en dos-cents animals d'experimentació sotmesos a la mateixa lesió nerviosa perifèrica per mètodes histològics (diàmetre del nervi, nombre absolut, densitat i diàmetre de fibres nervioses, diàmetre i superfície axonal, longitud mielínica, i relació de diàmetres axó/mielina), electrofisiològics (amplitud, latència i àrea sota la corba de PAMCs i PANCs, i velocitat de conducció nerviosa) i conductuals (índex funcional del nervi ciàtic) demostren que només correlacionen entre si els paràmetres d'una mateixa tipus de mètodes (Munro et al 1998). Paradoxalment, en cap cas dels estudiats, els resultats dels indicadors histològics o electrofisiològics garantitzen resultats quantitativament equivalents de la conducta de locomoció a excepció de situacions extremes amb una regeneració excel·lent o inexistent (Munro et al 1998). És clar que mentre els estudis de conducció nerviosa motora i sensorial i les proves d'avaluació nociceptiva i sudomotora permeten quantificar el grau de reinnervació per axons regenerats, la prova de la locomoció informa sobre la restitució d'una funció complexa i coordinada, que requereix d'una reinnervació adequada de les dianes musculars i sensorials i del restabliment dels mecanismes centrals d'integració sensòrio-motors que participen tant en la generació del moviment com en el seu control.

La deambulació és una conducta d'extremada complexitat que requereix no només de la integritat de les connexions centrals entre elements motores i sensorials amb el sistema nerviós central, sinó a la vegada d'un funcionament adequat i compatible amb la funció de circuits d'integració sensòrio-motora espinals i corticals. El *walking track* mesura la recuperació de la funció global complexa, de tal manera que fins i tot les contractures, els desequilibris i les alteracions del to muscular són fenòmens que depenen de les característiques quantitatives i qualitatives de la reinnervació i que alteren de manera real la marxa en els animals lesionats. La recuperació d'un patró equivalent al d'animals no lesionats després d'una lesió de compressió demostra que quan es donen les condicions adequades la prova és capaç de detectar i mesurar el retorn a la normalitat (De Medinaceli et al 1982, De Medinaceli 1988). Diverses variables poden ajudar a explicar l'absència de recuperació dels diferents paràmetres de la deambulació en lesions de secció i resecció: la inespecificitat de la reinnervació perifèrica després de lesions i l'efecte distorsionant de la plasticitat estructural i funcional de circuits espinals i corticals que es desencadenen després de lesions són probablement algunes de les hipòtesis fonamentals.

La verificació electrofisiològica de la reinnervació muscular és indicativa de la quantitat però no de la qualitat o especificitat de la reinnervació. Aquesta depèn de l'organització fascicular del nervi i les seves branques tributàries, aspectes mecànics i quirúrgics de la lesió i la reparació (Evans et al 1991, Zhao et al 1992b), l'acció del neurotropisme fascicular o d'òrgan diana (Politis et al 1982, 1985, Politis i Spencer 1983, Politis i Steiss 1985, Politis 1985, Doolabh et al 1996), preferència de la reinnervació motora i sensorial (Brushart et al 1988, 1990, 1993, Brushart et al 1998, Madison et al 1996), fenòmens de remodelació per eliminació selectiva de col·laterals (Brushart 1993, 1996,

Hennig i Dietrichs 1994, Brushart et al 1998) i modificacions de l'excitabilitat que comporten alteracions en la selecció i el reclutament de motoneurons per a la realització de moviments (Valls-Solé et al 1992, Angelov et al 1999, Cossu et al 1999). Tots aquests fenòmens són, a més, dependents de la reinnervació i estant controlats per multitud de senyals moleculars tròfiques i tròpiques que regulen les interaccions entre els axons regeneratius, les cèl·lules glials, la membrana basal i els seus òrgans diana (Tessier-Lavigne i Goodman 1996, Fu i Gordon 1997). En la via motora, les conseqüències de la reinnervació aberrant i la hiperinnervació són alteracions en l'activació de grups musculars específics per a la realització de moviments i la coactivació de músculs amb funcions no complementàries o fins i tot antagòniques (Wasserschaff 1990). A nivell sensorial, s'observen alteracions en la determinació de la qualitat, la intensitat i la localització d'estímuls perifèrics que en alguns casos són un *feedback* propioceptiu imprescindible per al control del moviment (Koerber et al 1994, 1995, Koerber i Mirnics 1996, Zehr et al 1997, Carrier et al 1997).

Tota lesió del sistema nerviós perifèric que produeixi la desaferentització d'un territori sensorial o la desconnexió central d'òrgans musculars desencadena canvis en l'organització connectiva i l'excitabilitat d'estructures espinals (Wasserschaff 1990, Koerber et al 1994, 1995, Koerber i Mirnics 1996), subcorticals (Garrathy et al 1990), corticals motores (Donoghe et al 1990, Sanes et al 1990) i somatosensorials (Doetsch et al 1996). Els canvis d'extensió dels mapes d'organització centrals van sovint acompanyats per modificacions estructurals i funcionals de les propietats bioelèctriques de les neurones afectades i de l'eficàcia de les sinapsis que estableixen amb d'altres neurones de l'entorn (Eccles et al 1954, Mendell 1984, Donoghe et al 1990, Sanes et al 1990). Aquest conjunt d'alteracions apareixen poques hores després de la lesió (Donoghue et al 1990) i en funció de la seva severitat (Wall et al 1983), l'extensió total del territori denervat (Huerta i Wall 1987), del nivell de recuperació final i, especialment, del grau d'especificitat assolit per la reinnervació perifèrica (Wall i Kaas 1986), poden retornar a la seva extensió i nivell d'excitabilitat originals. Un ampli i complex ventall de molècules tròfiques i tròpiques determina el sentit, la magnitud, la durada i la involució dels canvis esmentats (DiStefano 1992, Mendell et al 1999, McAllister 1999, Chew i Gallo 1999). En alguns casos, a més, la reorganització de circuits centrals no és adaptativa i dificulta el desenvolupament de la funció sensorial (Woolf et al 1992, Shortland i Woolf 1993) o motora. En aquest context, s'ha intentat posar de manifest que la lesió nerviosa perifèrica produeix una facilitació i la facilitació de respostes reflexes monosinàptiques i polisínàptiques espinals que poden alterar de manera dramàtica els mecanismes de generació i control del moviment. En la medul·la espinal, l'especificitat de la reinnervació perifèrica determina, no només el control neural d'òrgans diana, sinó també la funcionalitat de circuits reflexos que participen en el desenvolupament i el control de funcions complexes com la locomoció (Floeter 1998). La reorganització espinal o cortical de connexions pot ser utilitzat com un mecanisme de recodificació funcional de les terminals que reinnerven aberrantment dianes equivocades (Molander i Aldskogius 1990, Carrier et al 1997). La compatibilitat entre el patró de connexions perifèriques motora i sensorial i les projeccions centrals espinals i corticals és fonamental per permetre l'activació de grups musculars adequats i complementaris de cada moviment (Tresch et al 1999). Quan per alguna de les raons esmentades, a

més aquest canvis generats no involucionen amb la reinnervació, la recuperació del patró global d'activitats es veu impossibilitat i apareixen, entre d'altres problemes, alteracions en la coordinació i el control dels moviments (Gordon et al 1980, 1985, Wasserschaff 1990).

### 3. Especificitat de la reinnervació perifèrica

Si bé assolir un cert grau de regeneració i reinnervació perifèrica és un requisit indispensable per a la recuperació funcional, l'especificitat de la reinnervació és també necessària per a garantir que el nou patró de connexions perifèriques i centrals permeti la recuperació de funcions complexes. Després de lesions del sistema nerviós perifèric, la reinnervació pels axons regenerats podria presentar segons les teories *neurotròpiques* una especificitat de tipus *tissular* (els axons reinnerven l'extrem neural distal i no altres teixits), *fascicular* o de tronc nerviós (en un tronc plurifascicular l'extrem distal del seu fascicle original), *funcional* (els axons motors reinnerven teixit muscular i els sensorials estructures cutànies), *topogràfica* o regional (es projecten sobre dianes adequades de la mateixa regió que originalment innervaven) i finalment *d'òrgan diana* (els axons són capaços d'identificar específicament la seva diana original) (Doolabh et al 1996, Brushart 1998).

Per altres autors, la reinnervació no és mai específica i depèn d'un fenomen probabilístic que està condicionat, entre d'altres factors, pel diàmetre dels fascicles a reinnervar i de la qualitat de l'alineament quirúrgic. Després de lesions, és habitual la poliinnervació de les mateixes cèl·lules dianes per part de branques d'un mateix o diferents axons regeneratius (Gorio et al 1983), la hiperinnervació d'un òrgan distal per axons de diferents neurones (Angelov et al 1993, 1996) i la reinnervació inespecífica (Sumner 1990, Brushart et al 1993) amb totes les seves possibilitats combinatòries. L'especificitat depèn de la capacitat dels axons de col·lateralitzar sobre el màxim nombre de dianes distals i esperant que posteriorment, se seleccionin només aquelles terminals que permetin el desenvolupament correcte de la funció (Brushart 1990). Dos elements addicionals poden complicar encara més les característiques de la somatotopia postlesional: l'intercanvi transaxonal per efapsis d'impulsos nerviosos entre axons regeneratius (Sadjadpour 1975, Montserrat i Benito 1988), i alteracions de l'excitabilitat de circuits reflexos monosinàptics i polisínàptics necessaris per al control del moviment (Valls-Solé et al 1992, Cossu et al 1999). Les alteracions de l'especificitat de la regeneració i la reinnervació són responsables de la manca de precisió en la percepció de la localització i les característiques d'estímul sensorials i de la síndrome de paràlisi postquirúrgica, definida per discinèsies musculars, bloqueig i pèrdua de precisió i control del moviment, moviments associats involuntaris i alteracions en els reflexos motors (Valls-Solé et al 1992, Angelov et al 1998, Cossu et al 1999).

En aquest treball hem estudiat diferents aspectes de la qualitat de la reinnervació fascicular o anatòmica per mètodes funcionals i histològics. Mitjançant l'estimulació selectiva de fascicles s'ha pogut determinar la distribució dels territoris musculars, sensorials i autonòmics després de lesions perifèriques i el grau d'hiperinnervació de diferents dianes. Mitjançant el marcatge selectiu dels axons que reinnerven diverses dianes musculars s'ha pogut determinar d'una banda el percentatge de neurones que als 90 dies de la lesió envien branques múltiples a diferents músculs i, indirectament, el nombre de motoneurones que projecten equivocadament sobre dianes diferents a les corresponents.

Prèviament s'han definit en una sèrie d'animals controls els territoris d'innervació normal a l'extremitat posterior de la rata dels axons continguts entre els diferents fascicles. Mentre els axons motors mostren territoris musculars de projecció específics, la innervació sensorial dels nervis digitals presenta una component majoritària d'axons que viatgen a través del fascicle tibial però també una menor procedent del fascicle peroneal. De manera similar algunes àrees plantars i algunes GS mostren una innervació múltiple d'axons autonòmics sudomotors de diferents fascicles.

Les nostres dades mostren que la compressió nerviosa és la lesió que genera una menor proporció d'animals amb reinnervació inespecífica de territoris i d'hiperinnervació simultània de diferents dianes musculars, mentre que les lesions de resecció mostren nivells superiors a la de les lesions de secció. En aquest darrer tipus de lesió, la sutura directa realitzada mantenint la coaptació fascicular apropiada, assoleix valors de reinnervació inespecífica lleugerament més elevats que el grup de compressió, i un grau d'hiperinnervació muscular molt baix. La sutura directa creuada dels fascicles tibial i peroneal no inverteix totalment el patró d'innervació; un nombre minoritari però considerable d'axons motors, sensorials i autonòmics aconseguixen retornar, malgrat la sutura, al seu fascicle original. Al mateix temps en lesions de grau V de Sunderland, la presència d'una separació interneural, llarga o curta, reparada per tubulització amb una guia de silicona induïx un nivell d'errors de reinnervació en volum i proporcions d'animals superior a la de grups anàlegs reparats per sutura directa o empelt. Per contra, el tub de PLC és capaç de promoure, malgrat la distància interneural llarga, una reinnervació que és comparable en especificitat i baixos nivells d'hiperinnervació a la mostrada pel grup d'empelt, mentre que la tubulització fascicular assegura una gran selectivitat de la reinnervació en els pocs casos en què té èxit la regeneració. Malgrat que en lesions de compressió els axons sudomotors presenten nivells més elevats d'inespecificitat de dianes regionals, no es pot afirmar en termes globals, que hi hagi diferències en l'especificitat de reinnervació de diferents tipus d'axons. Les tendències apunten però, que els axons motors, sensorials i autonòmics del nervi tibial tenen més facilitat per a la reinnervació aberrant de territoris originalment innervats per axons del peroneal i del sural que a l'inrevés. A més, les dianes distals presenten un major grau de reinnervació aberrant i d'hiperinnervació que les proximals.

### **3.1. Avaluació de l'especificitat de la reinnervació: tècniques funcionals i morfològiques**

No són massa nombrosos els treballs que estudien l'especificitat fascicular de la reinnervació de dianes perifèriques per mitjà de tècniques electrofisiològiques. Amb l'excepció d'alguns estudis (Bernstein i Guth 1961, Gerding et al 1977, Evans et al 1991, Zhao et al 1992b, 1992c), la majoria d'autors han optat per abordar la qüestió per tècniques histològiques tradicionals (Letinsky et al 1976, Gorio et al 1983, Zhao et al 1992a, Lou i Lu 1996, Papaloïzos et al 1997), utilitzant traçadors neuronals anterògrads i retrògrads detectables per tècniques immunoenzimàtiques com l'HRP (*horseradish peroxidase*) (Brushart i Mesulam 1980, Brushart 1990, Swett et al 1991, Angelov et al 1993, 1998, Streppel et al 1998) o per fluorescència, aïllades o en combinació (Rende et al 1991, Molander i Aldskogius 1992, Madison et al 1996, Brushart 1989, 1993, Brushart et al 1998,

Angelov et al 1995, 1996, 1999). Les tècniques funcionals amb estimulació selectiva dels diferents fascicles del nervi permeten, a diferència de les tècniques histològiques, identificar els canvis produïts per la reinnervació sobre diferents poblacions d'axons al distingir-los segons les respostes funcional que produeixen i no exclusivament per característiques morfològiques o de localització que poden sofrir transformacions dràstiques després de la lesió. Al mateix temps, presenten l'avantatge de verificar que els canvis en la disposició de territoris durant la reinnervació aberrant no responen a modificacions estructurals sinó que són connexions funcionals en la transmissió de potencials d'acció i en l'activació d'òrgans diana i, per tant, tenen efectes funcionals per al subjecte. Per contra, les tècniques histològiques informen amb gran precisió de l'origen espinal d'una o diverses projeccions perifèriques, encara que sense determinar en quina mesura l'axó i la neurona marcades han arribat realment a innervar la diana i a establir connexions funcional. Per aquestes raons, els estudis funcionals ens permeten quantificar el grau de reinnervació aberrant o inespecífica d'axons de cada fascicle, mentre que les histològiques informen de la innervació múltiple o hiperinnervació al final del seguiment. Totes elles presenten algunes limitacions a considerar.

### *3.1.1. Estudis electrofisiològics*

L'estimulació elèctrica de fascicles per damunt del punt de lesió requereix d'una dissecció acurada dels diferents troncs que integren el ciàtic en una regió que, en major o menor mesura, ha estat afectada d'un cert grau de degeneració retrògrada (Cragg i Thomas 1961). En tots els casos s'ha procurat seccionar el nervi el més proximal possible i dissecar els principals fascicles fins al punt més allunyat possible de la lesió (aproximadament 10-15 mm proximalment). En alguns animals dels grups sotmesos a resecció aquesta dissecció ha resultat especialment complicada i ha obligat a descartar alguns animals en els quals no es tenien garanties d'haver identificat correctament els diferents fascicles. Al mateix temps, la dissecció del fascicle sural per damunt de la regió de lesió ha resultat difícil en una gran part d'animals dels grups de resecció i també de secció, perquè aquest fascicle s'origina en la rata a partir d'un feix d'axons emergent del fascicle tibial i un altre procedent del fascicle peroneal (Schmalbruch 1986). L'estimulació elèctrica ha estat aplicada per mitjà d'un elèctrode de succió per tal d'evitar la destrucció axonal produïda pel contacte directe del cordó nerviós amb electrodos metàl·lics (Navarro i Kennedy 1990a). En tot cas, comparant l'amplitud dels registres dels PAMCs i PANCs evocats per estimulació transcutània i directa amb elèctrode de succió, s'ha pogut detectar en animals controls una lleugera disminució d'amplitud que podria ser deguda a la pèrdua d'axons durant el procés de dissecció i succió (Evans et al 1991). Així, el resultat negatiu de la suma d'amplituds dels PAMCs del múscul plantar trobat en grups controls i experimentals pot ser deguda a que faltaria per quantificar l'aportació del sural, o bé a que la manipulació ha produït una certa pèrdua axonal.

Per altra banda, cal recordar que en animals controls, tan rates com ratolins (Navarro i Kennedy 1990b), la musculatura plantar i les GS de les àrees plantars  $\alpha$ ,  $\beta$  i D i dels dits 4t i 5è estan innervades per axons dels fascicles tibial i sural, mentre que els nervis digitals del 2n, 4t i 5è dits tenen aportació simultània del tibial, peroneal i sural. De cara a comparar les nostres dades amb les

d'estudis histològics, cal posar alguns interrogants sobre la correspondència entre grau d'innervació funcional encertada o equivocada i el nombre d'axons que reinnerven adequadament o aberrantment un òrgan diana. Així, es podria donar que en la reinnervació muscular o sudomotora, la mida de les unitats motores (fibres musculars innervades per axó) o la càrrega d'axons simpàtics necessaris per evocar sudoració en una glàndula difereixi segons es tracti de fibres nervioses correctes o incorrectes. En tot cas alguns treballs han mostrat una correlació entre el comptatge d'axons que reinnerven aberrantment una diana a través de tubs en "Y" i el grau de força tetànica que és capaç de desenvolupar (Zhao et al 1992a, 1992b, Politis et al 1985, Politis i Steiss 1985).

### 3.1.2. Estudis morfològics

En els estudis histològics, després dels 90 dies de seguiment, s'ha aplicat un de tres traçadors neuronals retrògrads (FG, FB i DiI) en cristalls sobre la superfície de secció del nervi. Els nervis tributaris han estat seccionats lluny de la zona de lesió, sense problemes de dissecció, en el punt més proper possible a l'entrada muscular, per tal que els axons marcats pel traçador representin de la manera més ajustada possible el nombre d'axons que han reinnervat el múscul. La sinaptogènesi muscular té lloc només 24 hores després del contacte entre axons i fibres musculars (Carmignoto et al 1983), per tant és probable que el marcatge identifiqui una petita subpoblació de neurones que encara no hagin establert sinapsis funcional. En tot cas, sí que seran axons situats en el fascicle nerviós marcat. La injecció intramuscular de traçador causa la seva dispersió en la massa d'alguns músculs, fet que incrementa la variabilitat de la captació i el temps de transport fins al soma en comparació amb l'aplicació directa de traçador sobre el nervi (Angelov et al 1996, 1999).

Com la gran majoria de retrotraçadors citoplasmàtics, el FB i el FG perden intensitat al llarg del temps i a partir de les 4 setmanes, poden extravasar-se a la glia circumdant, fent disminuir els comptatges de neurones marcades. El FB és el que millor es manté, donant marcatges efectius fins a les 24 setmanes després de l'aplicació (Novikova et al 1997). El DiI es transporta a través de membrana, tan anterògradament com retrògradament, a velocitat lenta, fet que limita el seu ús en distàncies molt llargues (Von Bartheld et al 1990, Ros et al 1995, Molecular Probes 1997). En el nostre estudi hem utilitzat la combinació d'aquest tres traçadors que en treballs previs s'ha mostrat com a efectiva per marcar neurones control i regeneratives (Madison et al 1996, Angelov et al 1999). Considerant la distància a recórrer (aproximadament 140-150 mm) i per assegurar un bon marcatge de les motoneurones, s'ha deixat 10 dies per al transport, període prou llarg per a la lenta difusió del DiI i no excessivament llarg com per esperar que el FB i el FG comencin a perdre part de la seva intensitat com a marcadors (Novikova et al 1997). La distinció entre els traçadors FB, FG i DiI s'ha realitzat mitjançant l'ús de filtres específics i per les diferències de coloració fluorescent. Mentre la distinció de dobles marcatges FB-DiI o FG-DiI són fàcils de fer per la superposició d'imatges amb fluorescència molt diferent en l'espectre visible, la identificació dels dobles marcatges FB-FG depenen més de l'apreciació de la suma cromàtica d'aquests traçadors, que dona un color gris-perla, més semblant a una tonalitat apagada del FB que de FG, raó per la qual els comptatges poden infravalorar aquesta combinació de dobles marcatges i els triples marcatges (FB+FG+DiI). En tot

cas, s'ha optat per traçar amb fluoròfors fàcils de diferenciar la font d'innervació de la musculatura antagonista flexora-extensora (gastrocnemi-FB, plantar-FG *versus* tibial anterior-DiI), i s'ha deixat per a la combinació més complicada la distinció de neurones que reinnerven simultàniament músculs innervats per branques del mateix nervi tibial (gastrocnemi-FB *versus* plantar-FG), situació que ha de comportar menys problemes funcionals. Utilitzant el principi de fraccionament (Gundersen 1986), s'ha fet el comptatge de neurones en una de cada tres seccions medul·lars, un cop comprovat en un grup de 6 animals control que comptant cadascuna de les seccions els resultats són equivalents. Tenint en compte que el diàmetre de les motoneurones se situa a l'entorn de 30-40  $\mu\text{m}$  i rarament supera les 50  $\mu\text{m}$  (Streppel et al 1998), es pot tenir seguretat de no comptar en seccions d'aquesta gruixària dues vegades la mateixa cèl·lula (Swett et al 1986).

El terme reinnervació aberrant fa referència a aquelles neurones que després de la lesió, el seu axó regenerat reinnerva equivocadament un òrgan diana tissularment o regionalment diferent al que innervava originalment. El mètode més utilitzat per a estudiar-la ha estat el marcatge seqüencial, consistent en premarcar immediatament després de practicada la lesió amb un traçador de llarga durada la població de neurones que envien els seus axons a un fascicle o òrgan diana determinat, permetre la regeneració durant un període de temps i tornar a marcar el fascicle amb un segon traçador en un punt distal a la lesió (Molander i Adskogius 1992, Hendry et al 1985, Rende et al 1991, Fritsch i Sonntag 1991). Les neurones que mostren doble marcatge són aquelles que han aconseguit reinnervar el mateix fascicle o diana, les que mostren només el primer significa que el seu axó o bé encara no ha regenerat fins al punt de marcatge o bé que ha reinnervat aberrantment altres zones. Les neurones que presenten només el segon traçador són aquelles que no pertanyien a la població original i que, després de la lesió, han regenerat aberrantment el seu axó pel fascicle estudiat. La poliinnervació consisteix en la reinnervació múltiple de la mateixa cèl·lula diana, generalment una fibra muscular, per axons terminals de diferents neurones. Acostuma a produir-se en les primeres fases de col·lateralització preterminal i arriba al seu màxim, depenent de la lesió, als 30 dies després d'una compressió de manera que, a partir d'aquest moment, disminueix per fenòmens de repressió sinàptica fins que la cèl·lula diana esdevé novament monoinnervada (Letinsky et al 1976, Gorio et al 1983). La hiperinnervació o innervació polineuronal consisteix en la innervació d'una diana per un nombre de cèl·lules superior a l'original i es pot quantificar com un augment del nombre de neurones marcades per un traçador retrògrad injectat en una determinada diana (Angelov et al 1993, Streppel et al 1998). La determinació de neurones que envien projeccions simultàniament a diferents dianes, a vegades amb activitats oposades, es pot quantificar també amb el comptatge de neurones que esdevenen doble marcades per dos traçadors aplicats en dues dianes diferents (Angelov et al 1999).

### 3.2. Característiques de la innervació i territoris musculars, sensorials i autonòmics

Les nostres dades neurofisiològiques permeten establir l'anatomia funcional dels territoris motors, sensorials i autonòmics dependents del nervi ciàtic en la rata, àmpliament utilitzats com a models experimentals. Pocs estudis han abordat l'anatomia funcional dels rosegadors. Per això cal recolzar-se en diversos treballs morfològics que han estimat el nombre d'axons mielínics i amielínics (Schmalbruch 1986), el nombre de motoneurons (Swett et al 1986) o el nombre de neurones sensorials als ganglis raquidis (Swett et al 1991, Prats-Galino et al 1999) dels diferents fascicles del nervi ciàtic en la rata.

#### 3.2.1. Territoris motors

El fascicle tibial es divideix en tres branques musculars. La primera dona innervació al cos lateral del gastrocnemi, al soli i continua en sentit descendent per innervar la musculatura plantar. La segona innerva el cos medial del gastrocnemi mentre que la tercera es projecta sobre els músculs flexor del primer dit, tibial posterior i flexor llarg tibial dels dits. A l'arribar al turmell, la primera d'aquestes branques es divideix en dues que són els nervis plantars lateral i medial. El nervi plantar lateral dona una branca anastomòtica cap al plantar medial i es projecta cap als músculs intrínsecs del 4t i 5è dits, acabant el seu trajecte a nivell dels seus espais interdigitals. El nervi plantar medial innerva els músculs intrínsecs medials i origina els nervis digitals del 1r, 2n i 3r dits (Greene 1955, Schmalbruch et al 1986, Verdú 1994). El nostre estudi de marcatge motoneuronal en controls mostra en acord amb d'altres treballs un nombre total de 2.000 neurones motores que envien projeccions a través del nervi ciàtic, de les quals 500 corresponen a la suma dels cossos lateral i medial del gastrocnemi (250 i 289), 94 al soli i unes 329 a un grup de flexors associats a aquest darrer múscul (Swett et al 1986). Les nostres dades electrofisiològiques i amb retrotraçadors indiquen que el nervi tibial dona innervació motora als grups de músculs flexors estudiats (plantar i gastrocnemi) i no a músculs extensors com el tibial anterior.

El nervi peroneal es divideix per sota del genoll en les seves branques superficial i profunda. El nervi peroneal superficial envolta el coll del peroné i innerva en la part antero-lateral de la cama els músculs peroneal lateral llarg i curt. Posteriorment es projecta sobre la regió dorsal de la pota fins a innervar els dits 2n, 3r, 4t i 5è, deixant el 1r dit pel nervi safè. El nervi peroneal profund dona per sota del genoll innervació al múscul tibial anterior, l'extensor llarg dels dits i l'extensor curt del 2n dit. Finalment, es dirigeix cap a la regió dorsal lateral de la pota distribuint-se fins al 2n espai interdigital (Greene 1955, Schmalbruch et al 1986, Verdú 1994). En el nostre estudi el marcatge de la innervació peroneal detecta una mitjana de 530 neurones pel múscul tibial anterior, nombre concordant amb el d'altres autors que han determinat 630 motoneurons pel conjunt dels músculs extensors (Swett et al 1986). L'estimulació elèctrica del fascicle peroneal evoca contracció exclusivament sobre els músculs extensors, entre ells el múscul tibial anterior.

El nervi sural, que surt per la part medial de la trifurcació de tronc ciàtic, viatja entre el cos lateral del gastrocnemi i el múscul *biceps femoris* acompanyat de l'artèria i la vena sural. En la cara lateral de la cuixa, envia una branca cutània a la regió lateral dorsal de la cama fins al 3r dit. En alguns animals, s'observa una branca anastomòtica cap al nervi plantar lateral. Finalment, el sural terminal es distribueix per davant del malèol lateral i innerva la pell del turmell (Greene 1955, Schmalbruch et al 1986, Verdú 1994). El nervi sural és un fascicle mixte de predomini sensorial que recull la sensibilitat del costat lateral dorsal de la pota (Nakanishi i Norris 1970, Peyronard i Charron 1982, Swett et al 1986). Conté un nombre reduït de fibres motores que innerven l'abductor i el flexor curt del 5è dit del peu (Swett i Woolf 1985) i, a través de l'anastomosi que estableix amb el nervi plantar lateral, podria innervar parcialment altres músculs plantars (Greene 1955). Els nostres resultats en controls demostren que l'estimulació del sural és capaç d'evocar en tots esls animals estudiats un 7% de l'amplitud total dels músculs plantars. Segons el nostre treball, les neurones que es projecten sobre el nervi sural se situen entre els nivells L5 i L6 i formen un agregat cel·lular d'un centenar de motoneurons disperses en l'extensió del nucli motor del nervi tibial. En cap cas s'ha trobat en animals controls motoneurons amb projeccions simultànies sobre dos o més múscul dels estudiats. També hem pogut comprovar que el nervi safè és exclusivament sensorial, donat que l'aplicació de traçadors no marca cap motoneurona.

En un pla longitudinal, el nucli del múscul tibial anterior és el més cranial (L3-L4) dels tres estudiats, seguit en direcció caudal pel del múscul plantar (L4-L5). Ambdós se situen superficials al límit entre substància gris i substància blanca espinal. D'altra banda, el nucli del cos medial del múscul gastrocnemi (L4-L5) se situa entre els dos anteriors però en una posició més profunda i propera al canal radicular (Swett et al 1986). En un pla transversal, el nucli del múscul tibial anterior comença més proper a la paret anterior medul·lar, seguit pels del múscul gastrocnemi i el plantar, mentre que el límit posterior dels nuclis de gastrocnemi i tibial anterior és semblant. Tot i la seva organització aparent, les nostres dades proven que els nuclis d'aquests tres músculs presenten zones de sobreposició i la seva morfologia s'allunya bastant d'un elipsoide ideal al qual s'han ajustat per defecte en els càlculs (Swett et al 1986, Brown i Hardman 1987). Altres autors han constatat a més, la gran variabilitat interindividual en la posició i el contingut en neurones dels nuclis motors (Brushart i Mesulam 1980, Brown i Hardman 1987) i les representacions sensorials als ganglis de les arrels dorsals (Prats-Galino et al 1999).

### 3.2.2. *Territoris sensorials*

Les dades funcionals indiquen que la innervació dels nervis digitals del 2n, 4t i 5è dits és múltiple per d'axons sensorials dels fascicles tibial i peroneal i en el 4rt i 5è dits també del sural. El patró d'innervació mostra molta variabilitat interindividual, raó per la qual les modificacions de les aportacions relatives d'innervació després de lesions no són fàcils d'interpretar (Prats-Galino et al 1999). Tenint això en compte, les nostres dades indiquen que el 4t nervi digital té una innervació múltiples tibial-peroneal, amb una aportació d'axons majoritària del nervi tibial. El nervi digital del 5è dit mostra en la majoria d'animals innervació exclusivament per axons del tibial, encara que en un

nombre gens menyspreable és múltiple (tibial-peroneal-sural); també és el nervi que té la major contribució d'axons del fascicle sural, encara que funcionalment la major part dels axons provenen del fascicle tibial. El nervi digital del 2n dit mostra en una proporció semblant de rates innervació exclusiva d'axons del tibial o múltiple tibial-peroneal, amb un contingent d'axons majoritari del fascicle tibial. Diversos autors han detectat en acord amb els nostres treballs, la sobreposició de projeccions en territoris digitals de diferents fascicles nerviosos (Greene 1955, Schmalbruch et al 1986) o de les seves projeccions als ganglis de l'arrel dorsal (L3-L5). Aquesta és molt important per a les fibres C i més restringida per a les sensorials gruixudes A $\beta$  (Takahashi et al 1993, Prats-Galino et al 1999). Estudis realitzats en rates per extravasació amb blau d'Evans que marca el territori d'innervació d'axons tipus C, mostren que el nervi sural es projecta sobre la regió lateral externa de la pota i el 5è dit, amb predomini a la pell dorsal, (Povlsen et al 1993), fet concordant amb els nostres resultats electrofisiològics. També en acord amb els nostres resultats, alguns treballs descriuen que l'estimulació elèctrica de l'arrel dorsal L4, on es troben el 80% de les fibres sensorials del fascicle peroneal (Swett et al 1991, Prats-Galino et al 1999), produeix l'extravasació de marcador sobre les regions cutànies dorsals i ventrals medials incloent 2n, 3r i 4t dits de la pota i en canvi, no sobre la regió del 5è dit (Takashi et al 1994). El nervi safè, que no ha estat avaluat en el nostre cas, es projecta sobre la regió dorsal interna i els dits 1r i 2n de la pota (Greene et al 1955, Wiesenfeld-Hallin et al 1988, 1989). El fascicle tibial, que conté la població més elevada de fibres sensorials procedents majoritàriament dels ganglis raquidis L4 i L5, es projecta a través dels nervis plantars lateral i medial sobre els territoris plantars del 2n, 3r, 4t i 5è dits (Greene 1955, Takahashi et al 1994, Povlsen i Hansson 1995, Prats-Galino et al 1999). El primer dit presenta innervació procedent majoritàriament de L3 (Greene 1955, Swett et al 1991, Prats-Galino et al 1999). Donada la innervació fascicular múltiple dels nervis digitals en animals controls, l'avaluació de modificacions del patró d'innervació és complicat de determinar amb precisió.

### 3.2.3. *Territoris sudomotors*

Segons les nostres dades, la innervació sudomotora de la regió plantar depèn majoritàriament d'axons autonòmics del fascicle tibial que estimulen el 94% de les GS distribuïdes pels sis coixinets plantars i les puntes dels 5 dits (Navarro i Kennedy 1990a). L'estimulació elèctrica del nervi peroneal no evoca en la majoria d'animals activitat sudmotora, i en els pocs que ho fa (3/32 animals) la genera en GS de la punta del 4t i 5è dits. El fascicle sural activa el 8% de les GS totals evocades pel ciàtic, especialment al coixinet  $\beta$  i la punta de 5è dit. Els únics estudis sistemàtics que han abordat els territoris de sudoració dels diferents fascicles del ciàtic han estat desenvolupats en ratolins (Kennedy i Sakuta 1984, Navarro i Kennedy 1990a, 1990b, Vilches et al 1998), i alguns dels pocs estudis realitzats en la rata mesuren exclusivament el comptatge total de GS obtingudes per estimulació elèctrica (Bharali et al 1988) o farmacològica (Stevens i Landis 1987). Com a principal diferència del patró d'innervació entre el ratolí i la rata, es detecta que en el ratolí, l'estimulació elèctrica i colinèrgica evoca sudoració a les regions interfalàngiques, en les quals la rata no presenta GS. També en ratolins, l'estimulació del peroneal evoca sudoració a les regions interfalàngiques i les puntes del 3r, 4t i 5è dits, regions similars al dermatoma de projecció sensorial (Takahashi et al

1994), mentre que en la rata no innerva territoris sudomotors apreciables. La hiperinnervació constitutiva d'algunes regions sudomotores, que en la rata afecta preferentment els coixinets  $\beta$  i A i la punta del 5è dit (innervació doble tibial-sural), abarca en el ratolí territoris més extensos al llarg de tota la regió plantar i implica els fascicles tibial, peroneal, sural i safè (Kennedy i Sakuta 1984, Navarro i Kennedy 1990a). En el nostre model, la distribució anatòmica dels territoris fasciculars sudomotors i l'extensió limitada de les regions de superposició permeten identificar amb facilitat els canvis postlesió dels territoris de projecció.

#### 3.2.4. *Característiques estructurals dels fascicles del nervi ciàtic*

Donat que el nostre model experimental analitza la capacitat dels axons del tronc ciàtic seccionats entre 5-6 mm per damunt de la trifurcació a la fossa poplità, de projectar-se correctament dins del seu fascicle original, la mida de cada fascicle i la seva posició relativa respecte del tronc ciàtic determina, a més del possibles condicionants neurotròpics, la capacitat de reinnervació específica. El nombre d'axons totals i la proporció de fibres mielíniques i amielíniques donen informació sobre la quantitat de tubs endoneurials de cada fascicle als quals es troba enfrontat un axó regeneratiu després de la lesió. A partir de treballs on s'ha estimat la mida de cada fascicle, el nombre d'axons mielínics i amielínics i el nombre aproximat de motoneurons i neurones sensorials que hi projecten (Jenq i Coggeshall 1984, 1985, Swett et al 1986, Schmalbruch 1986, Peyronard et al 1988, Swett et al 1991, Prats-Galino et al 1999) s'han resumit les dades mostrades a la Taula V.3.1, que poden ser d'interès per a la discussió.

El nervi ciàtic té una àrea de secció transversal d'uns 250 mm<sup>2</sup> i uns 33.000 axons, que es divideixen en 7.800 fibres mielíniques, 19.000 amielíniques (sense comptar les autonòmiques) i 6.000 autonòmiques simpàtiques. Corresponen aproximadament a 2.000 neurones motores a la banya anterior dels nivells L3 a L6 i 10.500 neurones sensorials situades als ganglis de les arrels dorsals de L3 fins a L5. El fascicle tibial té una àrea de secció de 166 mm<sup>2</sup> (66% del total del ciàtic) amb un total de 17.200 axons (4.500 axons mielínics, 9.000 amielínics i 3.700 simpàtics), que corresponen a 980 motoneurons localitzades entre L4-L6 i 4.700 neurones sensorials dels ganglis L4 i L5. El fascicle peroneal mesura 74 mm<sup>2</sup> (29% del ciàtic) i conté un total de 7.200 axons (1.900 mielínics, 4.200 amielínics, 1.100 simpàtics) corresponents a 630 motoneurons localitzades en dues subpoblacions a nivell L4 i 2700 neurones sensorials, majoritàriament al gangli L4. Finalment, el fascicle sural mesura 20,5 mm<sup>2</sup> (8% del ciàtic) de secció, per un total de 6.800 axons (1.050 mielínics, 3.500-4.300 amielínics no autonòmics i 1.500 simpàtics), provinents de 68-100 motoneurons situades a L5 i unes 2.000 neurones sensorials del gangli L5. El tronc del nervi ciàtic per damunt de la trifurcació origina una branca cutània sensorial en direcció lateral anterior de 7,2 mm<sup>2</sup> de superfície (2,8% de la secció del ciàtic) amb un total de 2.200 axons (350 axons mielínics i 1855 amielínics) que en els nostres animals ha estat resecada en el moment de l'operació.

**Taula V.3.1.** Estimació de l'àrea de secció (mm<sup>2</sup>) i el percentatge sobre el total de nervi ciàtic (%), el n° total d'axons, n° d'axons mielínics, amielínics no simpàtics i simpàtics i n° de neurones motores sensorials del tronc ciàtic i les branques tibial, peroneal, sural i cutània de rates adultes Sprague-Dawley i/o Wistar entre 250-300 gr de pes.

| Nervi    | Àrea secció (mm <sup>2</sup> ) | n° total axons | n° axons mielínics | n° axons amielínics | n° axons simpàtics | n° neuron. motores | n° neuron. sensorials |
|----------|--------------------------------|----------------|--------------------|---------------------|--------------------|--------------------|-----------------------|
| Ciàtic   | 253,2 (100%)                   | 33.000         | 7.800              | 19.000              | 6.000              | 2.005              | 10.500                |
| Tibial   | 166,2 (66%)                    | 17.200         | 4.500              | 9.000               | 3.700              | 982                | 4.748                 |
| Peroneal | 73,8 (29%)                     | 7.200          | 1.900              | 4.171               | 1.100              | 632                | 2.699                 |
| Sural    | 20,5 (8%)                      | 6.800          | 1.050              | 4.305               | 1.500              | 68-100             | 1.675                 |
| Cutani   | 7,2 (2%)                       | 2.200          | 350                | 1.855               | 0                  | -                  | -                     |

### 2.3. Marcatges neuronals de grups experimentals: afectació neuronal per la lesió

Els comptatges globals del nombre de motoneurones marcades amb diferents traçadors a nivell dels nervis dels músculs tibial anterior, gastrocnemi i plantars, comparats amb els valors en animals controls, ens dona una idea del grau de mort neuronal o de manca de regeneració axonal que ha afectat aquestes cèl·lules als tres mesos de les diferents lesions i reparacions. Els grups sotmesos a tubulització d'una distància llarga de 8 mm mostren un nombre total de motoneurones inferiors als de la resta de grups, que no presenten diferències significatives respecte del grup control. El grup tubulitzat amb silicona (SIL8) presenta un recompte total inferior al control, la compressió, els grups de secció i l'empelt i no massa diferent al de PLC (PLC8), malgrat que l'elevada variabilitat interindividual fa que no es trobin diferències estadísticament significatives. Les neurones motores són en general poc susceptibles a l'axotomia, especialment quan la lesió es produeix, com és aquest cas, a molta distància del nucli (Melville et al 1989, Gordon et al 1991, Fu i Gordon 1997). En tot cas, la resistència a la privació d'una font adequada de factors tròfics durant el temps que els axons triguen a contactar amb l'extrem distal del nervi és un factor clau (Purves 1975, Brushart 1989, 1993, McMahon i Gibson 1987), especialment en aquelles lesions reparades per tubulització amb *gaps* llargs en les quals, el temps de trànsit intratubular endarrereix l'arribada al segment distal (Longo et al 1984, Williams 1983, Butí et al 1996, Butí 1994). La disminució del nombre total de neurones marcades en els grups tubulitzats amb *gaps* llargs posa de manifest que alguns animals no han pogut regenerar una proporció d'axons motors, o bé que han sofert la mort d'un contingent de motoneurones o que la lesió ha disminuït la seva capacitat per al transport del traçador fins al soma. De fet, algunes de les imatges recollides d'aquests grups mostren que les cèl·lules marcades amb FB, FG i DiI, traçadors que es distribueixen en els controls pel soma i les dendrites de manera àmplia, només presenten agregats de fluorescència sense que s'observi un marcatge homogeni del soma i encara menys dels processos dendrítics. Altres estudis han demostrat que la capacitat de captar i retrotransportar HRP en neurones sensorials no es modifica després d'una compressió nerviosa, però queda seriosament alterada en durada i quantitat després de seccions no reparades o amb

reparació diferida. La reparació per sutura directa del nervi a l'extrem distal corresponent induïx la recuperació de la capacitat de transport retrògrad, en major grau que quan la regeneració es produeix sobre extrems distals o dianes perifèriques no corresponents (Peyronnard et al 1988). La disminució del nombre de neurones afecta tant les marcades amb substàncies que es transporten axonalment, com FG i FB, com les que ho fan per difusió de membrana com amb el DiI (Von Bartheld et al 1990, Rost et al 1995, Molecular Probes 1997). Aquest fet indica que si es tracta de neurones sobrevivents amb alteracions metabòliques, una part d'aquestes presentaria no només seriosos problemes de transport axonal, sinó l'alteració o la desestructuració de les característiques lipofíliques de llurs membranes que obstaculitzaria la correcta difusió del DiI.

### 3.4. Efectes de diferents tipus de lesions sobre l'especificitat de la reinnervació

Hi ha 4 tipus de fenòmens importants a l'entorn del problema de l'especificitat de la reinnervació que són conjuntament responsables de l'anomenada síndrome de paràlisi postquirúrgica (Kimura et al 1975, Montserrat i Benito 1988, Valls-Solé et al 1992):

- La reinnervació aberrant o inespecífica (*misdirected reinnervation*) que fa referència a les neurones que després d'una lesió axonal regeneren i reinnerven un òrgan diana tissularment o regionalment diferent al qual innervava originalment (Sumner 1990).
- La poliinnervació o reinnervació múltiple de la mateixa cèl·lula diana per axons terminals de diferents neurones. Acostuma a produir-se en les primeres fases de col·lateralització preterminal i arriba al seu màxim, depenent de la lesió, als 30 dies després d'una compressió de manera que, a partir d'aquest moment, disminueix per fenòmens de repressió sinàptica fins que la cèl·lula diana esdevé novament monoinnervada (Letinsky et al 1976, Gorio et al 1983).
- La hiperinnervació o innervació polineuronal de dianes (*misdirected sprouting*) consisteix en la innervació d'una diana per un nombre de neurones superior a l'original. Es pot quantificar com un augment del nombre de neurones marcades per un traçador retrògrad injectat en una determinada diana (Angelov et al 1993, Streppel et al 1998) o pel comptatge de neurones que esdevenen doble marcades per dos traçadors aplicats en dues dianes diferents (Angelov et al 1999).
- L'excitació creuada entre axons regeneratius per efapsis en el punt de lesió, que pot conduir a l'activació simultània d'axons amb activitats no complementàries o antagonistes (Sadjadpour 1975).

Tots ells es poden quantificar utilitzant tècniques diferents. En el nostre treball, la reinnervació aberrant, la poliinnervació i l'efapsis han estat directament o indirectament avaluades per l'estudi electrofisiològic, mentre que el grau d'hiperinnervació i/o la innervació polineuronal s'ha quantificat per mitjà dels estudis de traçadors.

Quan la suma de les amplituds dels PAMCs, PANCs o el nombre de GS evocades per estimulació elèctrica dels diferents fascicles que formen el ciàtic superen la resposta màxima evocada prèviament per tot el tronc d'aquest nervi, significa que o bé hi ha axons que estan polinnervant les mateixes

cèl·lules diana i que aquestes responen a estímuls procedents de fascicles diferents, o bé que a nivell de la regió de lesió l'excitació dels axons d'un fascicle és capaç d'induir la despolarització d'axons de fascicles veïns. En l'apartat de resultats aquesta suma ha estat referida amb el terme genèric de *poliinnervació*. Ara bé, per atribuir a una o altra explicació (*poliinnervació versus efapsis*) aquest fenomen cal tenir en compte que hi ha dianes que en controls ja mostren un cert nivell de poliinnervació (les GS) o en les quals s'ha demostrat l'existència de poliinnervació després de lesions (fibres musculars). D'altra banda, en els registres de PANCs obtinguts directament dels nervis digitals, l'única explicació plausible a aquest fenomen és l'excitació creuada per efapsis, donat que no es registra la resposta de la diana o receptor cutani sinó l'arribada del potencial d'acció dels diferents axons en conducció antidròmica en el punt de registre. Cal, per últim, assenyalar que els diferents fenòmens d'especificitat han estat estudiats de manera parcial en diversos models experimentals (espècie animal, tipus de tronc perifèric) i varietat de mètodes d'avaluació, fet que dificulta la seva comparació. A més pocs treballs han avaluat sistemàticament l'efect de lesions i diferents tipus de reparacions, entre elles la tubulització.

### 3.4.1. Lesions per compressió

Les nostres dades indiquen que la reinnervació després d'una compressió és la més específica de la verificada als grups experimentals estudiats, en acord amb la majoria d'autors (Letinsky et al 1976, Swett et al 1991, Brown i Hardman 1987, Molander i Aldskogius 1992). Morfològicament no hi ha signes d'hiperinnervació muscular i només un nombre molt reduït de neurones (2,5%) amb múltiples projeccions en diferents dianes musculars en tots els animals. El grau de reinnervació aberrant funcional dels diferents grups musculars oscil·la entre 5-9% (respecte 81-100% d'encert) i afecta una proporció d'entre 2/6 i 3/6 animals, fet que indica que les dobles projeccions detectades amb traçadors no són totes funcionals o com a mínim suficients com per generar un PAMC detectable. Destaca l'elevat índex d'innervació aberrant de territoris sudomotors, que sembla produït per mitjà d'una gran poliinnervació glandular. Diversos estudis han demostrat la gran capacitat de col·lateralització de fibres sudomotores intactes o axotomitades en territoris denervats, fins i tot allunyats (Kennedy et al 1988, Navarro i Kennedy 1988). Per als territoris sensorials i motors, el grau de poliinnervació no és significativament del del grup control. En principi, cal esperar que el manteniment dels tubs endoneurials limiti la col·lateralització inicial dels axons regeneratius, acceleri l'elongació i dirigeixi els axons de manera específica a les seves dianes originals (Devor i Govrin-Lippmann, 1979, Sunderland 1991). S'ha descrit anatòmicament, però, que després de compressions algunes fibres nervioses poden escapar-se dels seus tubs endoneurals i reinnervar territoris diferents als corresponents (Gutmann i Young 1944). Alguns treballs han descrit un 1-2% d'axons sensorials del sural que no retornen al seu fascicle després d'una compressió del nervi ciàtic (Molander i Adskogius 1992), un 15% de les motoneurones del fascicle peroneal que reinnerven dianes diferents al múscul tibial anterior (Swett et al 1991), o la innervació inespecífica per un 3% de neurones no corresponents al nucli motor original del nervi plantar (Brown i Hardman 1987) després d'aquest mateix tipus de lesió. Altres troballes assenyalen després de compressions un 15-20% de fibres musculars poliinnervades per diversos axons (Bernstein i Guth 1961, Letinsky et al 1974, Kuiken et

al 1995). Tot i que aquestes dades demostren que, per lleu que sigui la lesió, després d'una compressió es produeixen alteracions de l'especificitat de la reinnervació, aquestes no semblen ser suficientment importants com per alterar la recuperació de la funció global de locomoció (De Medinaceli et al 1989).

### 3.4.2. *Tubulització versus sutura directa en distàncies interneurals curtes*

Després d'una secció completa, la sutura directa presenta nivells d'innervació múltiple de dianes musculars (2,2%) similars o lleugerament inferiors a la compressió, mentre que la tubulització amb silicona amb un *gap* curt genera percentatges de neurones amb múltiples projeccions tres vegades superiors (6,5%). Aquesta dada es corrobora amb els percentatges de neurones marcades, que mostren una transferència d'axons dels músculs gastrocnemi i tibial anterior cap al múscul plantar que a més, és hiperinnervat per un 21% de motoneurones addicionals respecte al control. La sutura directa correctament alineada genera també nivells de reinnervació aberrant muscular (7-16% d'error i 78-89% d'encert) superiors a la compressió, en una proporció superior d'animals. Altres treballs amb traçadors també demostren nivells més grans d'errors de la reinnervació produïts per una sutura respecte de la compressió nerviosa (Molander i Aldskogius 1990, Fritzsche i Sonntag 1991). Fins i tot, Hendry et al (1996) van trobar que només un 50% dels axons simpàtics seccionats i suturats aconseguix reinnervar la seva diana original. El treball de Evans i col·laboradors (1991), realitzat amb tècniques electrofisiològiques en un model gairebé idèntic al nostre, mostra després d'un tall i sutura valors de reinnervació funcional aberrant del múscul gastrocnemi i del múscul tibial anterior (75% encert i 10% d'error en ambdós) semblants als obtinguts als nostres experiments. El grau d'hiperinnervació després de secció i sutura del nervi facial, que dona un 32% de neurones addicionals als 4 mesos de la reparació (Angelov et al 1996) és un valor comparable amb el mostrat pel múscul plantar en el grup de tall i sutura del ciàtic. També s'ha detectat després de secció i sutura de la branca bucal del VIIè parell cranial un 23% de neurones amb dobles projeccions als fascicles bucolabial inferior i superior, que innerven a la vegada diferents regions de la *vibrissa* de la rata, amb tendència a disminuir amb el temps fins a un mínim de l'11% (Angelov et al 1999), valors superiors als verificats per qualsevol dels nostres grups experimentals (2-10% com a màxim). Aquestes diferències són comprensibles en lesions que afecten una única branca de gran calibre, sense derivacions per sota del punt de lesió, amb dues branques terminals que innerven un mateix territori exclusivament muscular. Altres estudis realitzats en el nervi femoral i que han estudiat l'especificitat de la reinnervació motora-sensorial demostren que després d'una secció suturada deixant un petit *gap* de 0,5 mm per evitar un fals alineament mecànic, entre un 55-65% de les motoneurones reinnerven adequadament el fascicle motor d'aquest nervi, un 25-35% reinnerven aberrantment la branca sensorial, mentre que el 8-10% envien simultàniament branques en ambdós fascicles als 90 dies de la lesió (Brushart 1993, Madison et al 1996, Brushart et al 1998). El percentatge funcional de reinnervació aberrant del nostre model de fascicles mixtes plurifasciculars després de lesions de tall i sutura o tubulització d'un *gap* de 4 mm, sembla mostrar una reinnervació muscular més específica, amb un menor índex d'errors fasciculars, un major índex d'encerts i al final del seguiment, un percentatge de neurones amb dobles projeccions també inferior. De fet, treballs amb marcatge

seqüencial en el mateix model del nervi femoral demostren més d'acod amb els nostres resultats que entre 50-78% de neurones motores i 49-76% de sensorials reinnerven el seu fascicle original en lesions de secció i sutura (Madison et al 1996). La capacitat de regeneració després de la sutura immediata, estimulada per un contacte precoç amb el segment distal i la cicatriu en la línia de sutura afavoreix la col·lateralització axonal, que explica aquest excés de projeccions.

Segons les nostres dades i les d'Evans et al (1991), la tubulització amb una guia de silicona no resulta ser una alternativa que redueixi el grau de reinnervació inespecífica, donat que en gairebé tots els animals i per a totes les funcions estudiades s'observen alteracions que superen significativament en percentatge les verificades per la sutura ben alineada (25-32% d'innervació funcional aberrant i 6,5% de motoneurons amb projeccions múltiples). Zhao et al (1992b), en un estudi de la quantitat i la qualitat de la reinnervació funcional amb diferents reparacions de distàncies interneurals curtes, conclouen que la tubulització amb silicona, si bé aconsegueix nivells de recuperació de la tensió muscular inferiors, produeix una reinnervació muscular més específica que la sutura epineurial i similar a la sutura fascicular o perineurial del nervi ciàtic. El grau de dissecció proximal dels fascicles previ a la sutura fascicular, variable segons el treball i la zona de lesió, pot explicar aquestes diferències. Considerant l'existència de propietats neurotròfiques entre els axons regeneratius i els seus respectius fascicles distals (Politis et al 1982, Politis i Spencer 1983, Politis i Steiss 1985, Seckel et al 1986, Brushart 1993, Luo i Liu 1996) o òrgans diana (Brushart i Seiler 1987, Brushart 1988, 1993, Zhao et al 1992a, 1992c), alguns autors han postulat que tubulitzar una distància curta podria ser favorable respecte al risc d'una sutura mal alineada, donat que aquest curt espai deixaria expressar les senyals biològiques neurotròpiques que aconsegueixen guiar l'axó cap al destí correcte (Evans et al 1991, Doolabh et al 1996, Luo i Lu 1996, Brushart 1998, Zhao et al 1992c). De fet, a excepció d'un dels primers treballs (Brushart i Mesulam 1980), el grup de Brushart i col·laboradors ha substituït el model de sutura directa per una tubulització amb silicona dels extrems deixant una distància interneural mínima de 0,5 mm que permeti els axons "prendre decisions" sense trobar-se forçats quirúrgicament a escollir el camí traçat per la sutura (Brushart 1988, 1990, 1993, Madison et al 1996, Brushart et al 1998). Els nostres resultats demostren que l'únic efecte favorable respecte de la sutura fascicular ben alineada que mostra la tubulització és una reducció de l'elevat nivell d'hiperinnervació del múscul plantar (12% respecte 23%), que d'altra banda es contraresta amb un increment de la poliinnervació de dianes musculars proximals. Amb la tubulització, la capacitat de col·lateralitzar disminueix en comparació a nivells controls a mesura que la regeneració es desplaça distalment (Jenq i Coggeshall 1985), fet que podria justificar aquesta poliinnervació de la musculatura proximal i la reducció de la hiperinnervació distal. Cal dir que altres autors no han trobat cap mena de selectivitat fascicular en la reinnervació de nervis mixtes i plurifasciculars, com el tibial o el peroneal (Weiss i Hoag 1946, Abernethy et al 1992, Zhao et al 1992a, 1992c), o bé l'han demostrada exclusivament en referència a fascicles motors *versus* sensorials, però no en fascicles nerviosos mixtes (Brushart i Seiler 1987, Brushart 1988, 1993, 1996, Madison et al 1996). Fins i tot quan afirmen demostrar-la, accepten que aquesta selectivitat no evita que fins a un 48% de la innervació funcional del múscul tibial anterior correspongui a axons aberrants del nervi tibial (en

front del 51% del fascicle peroneal) o a l'inrevés un 20% de la innervació del múscul gastrocnemi correspongui al fascicle peroneal, en guies amb 6 mm de *gap* (Politis i Steiss 1985), o que entre un 25-30% dels axons dels fascicles tibial o peroneal innerven en un tub en "Y" extrems distals equivocats després d'una secció amb un *gap* de 4 mm (Zhao et al 1992a). Finalment, un 25-35% dels axons motors del nervi femoral es projecten equivocadament sobre el seu fascicle cutani en lesions amb 0,5 mm de distància interneural (Brushart 1993, 1996, Brushart et al 1998). El conjunt d'aquestes dades, independentment de les diferències de model i mètode de mesura, s'adapten als resultats mostrats pels nostres grups de sutura i tubulització en distàncies curtes.

### 3.4.3. Sutura creuada iatrogènica versus tubulització

Les nostres dades assenyalen que la sutura creuada dels fascicles peroneal i tibial no inverteix de manera absoluta ni el patró d'innervació muscular, sensorial i sudomotora perifèrica, ni el posicionament de les poblacions de motoneurons espinals. Si bé en aquest grup el percentatge d'innervació fucional aberrant, forçada per la reparació, (66-72%) supera el d'encerts (34-42%), es demostra que un percentatge important d'axons aconseguixen regenerar i resituar-se al seu fascicle original o projectar-hi alguna branca adicional (Gerding et al 1977, Gordon et al 1991, Evans et al 1991, Angelov et al 1993, Gruart et al 1996). El percentatge de neurones que mostren projeccions simultànies a diferents músculs se situa per damunt del grup equivalent de sutura directa alineada i per sota de la tubulització amb silicona (4,9%). Així, una sutura mal alineada és responsable d'alteracions de reinnervació aberrant superiors a la tubulització (Evans et al 1991), però en canvi, limita d'alguna manera, en relació a aquest grup, la hiperinnervació muscular i la poliinnervació, mostrant un nombre de neurones amb múltiples projeccions inferior al grup SUTC. Paradoxalment, no s'observa innervació polineuronal del múscul tibial anterior que en aquesta reparació creuada passa a rebre innervació d'un tronc amb una quantitat d'axons molt superior a la del seu original. Sembla que l'escapament d'axos del fascicle aberrant cap a l'original no contribueix a incrementar el grau d'innervació muscular per damunt dels valors controls, sinó que compensa d'alguna manera els dèficits provocats per la lesió o la reparació en les dianes de cada fascicle. Aquesta reorganització resulta finalment en un dèficit d'innervació del múscul gastrocnemi, ara innervat pel fascicle peroneal de menor calibre, que no afecta gaire la musculatura plantar. Aquests resultats contrasten amb alguns treballs que han observat hiperinnervació mantinguda de la *vibrissa* després de la reparació d'una secció facial per anastomosi d'un fascicle amb un nombre significativament menor d'axons que el segment proximal del facial (anastomosi hipoglós-facial), produït per l'entrada massiva de fibres del facial sobre el seu extrem distal original (Angelov et al 1993). La sutura creuada presenta els desavantatges de forçar mecànicament una reinnervació no específica de fascicles mixtes i plurifasciculars amb una inversió parcial dels territoris d'innervació, però al mateix temps els avantatges d'una sutura directa, amb poca tendència a la col·lateralització i per tant amb nivells baixos d'hiperinnervació i poliinnervació musculars.

La sutura directa dels caps nerviosos confronta l'axó amb fascicles distals sense oferir la possibilitat d'escollir entre fascicles. Amb la tubulització l'axó pot col·lateralitzar àmpliament al llarg del trajecte

intratubular i generar un nombre de branques col·laterals superior al cas anterior, fet que incrementa les possibilitats de reinnervació i, en paral·lel, de produir aberracions si no s'indueix una eliminació selectiva de col·laterals inespecífiques. En cas de sutures iatrogèniques creuades, els avantatges sobre l'especificitat de la tubulització deixant la mínima distància interneural, són, com demostren els nostres resultats, prou òbvies. La rotació de 180° dels extrems nerviosos d'un tronc plurifascicular com el ciàtic té efectes completament diferents si es repara la lesió per sutura directa o per tubulització. Tot i que els nivells de quantitat i qualitat de la reinnervació no arriben a igualar completament els de la sutura ben alineada, la tubulització desorientada dels extrems (gir rotacional de 180°) ofereix encara la possibilitat que una majoria d'axons reinnervin la seva diana corresponent, cosa que no és possible amb la sutura directa equivocada (Evans et al 1991). Diversos treballs han mostrat que, en distàncies interneurals curtes de 4 mm en la rata tubulitzades amb silicona, el nombre d'axons mielínics i amielínics en el centre de la guia creix a partir dels 2 mesos fins arribar a un màxim de 1,4-1,7 vegades superior al dels valors controls i posteriorment tendeix a disminuir (entre 0,9-1,4) en segments més distals (Jenq i Coggeshall 1984, 1985, Mackinnon et al 1991). Amb *gaps* mínims de 0,5 mm la proporció entre fibres mielíniques a nivell distal *versus* proximal als 60 dies en el femoral és de només 1,26 (Madison et al 1998). Aquestes dades indiquen que la tubulització en espais curts no limitants permet la generació més àmplia de branques col·laterals i incrementa les possibilitats d'innervació de dianes per branques múltiples. Altres autors que han comparat el model de tubulització (gap de 5 mm) amb el tall i sutura no han trobat però diferències en el nombre d'axons mielínics 20 mm distals al punt de lesió (Evans et al 1991). Com ja s'ha esmentat, en nervis amb branques sensorials i motores pures, s'ha demostrat que per fenòmens d'esporgada (*pruning*) les branques de motoneurons incorrectament regenerades en fascicles sensorials tenen tendència a eliminar-se amb el temps (Brushart 1990, 1993, Zhao et al 1992a, Hennig i Dietrichs 1994, Brushart et al 1998). En aquesta línia, promoure la col·lateralització axonal seria una garantia que després del procés d'eliminació selectiva, que també es produeix en absència de diana distal, tendeix a millorar l'especificitat de reinnervació (Brushart et al 1998). Efectuant una lesió condicionant de compressió entre 14 i 30 dies abans de la lesió, incrementa després de la secció, la raó de col·lateralització distal/proximal i afavoreix l'especificitat de la reinnervació sensòrio-motora del nervi femoral (Brushart et al 1998). El model d'especificitat en fascicles mixtes o troncs plurifasciculars mostra alguns elements de complexitat adicional, derivats del fet que tant el fascicle tibial com el peroneal i el sural poden atraure axons sensorials i motors. Fenòmens de reinnervació preferent motora (Brushart 1990) o sensorial (Madison et al 1996) induïts per eliminació selectiva poden arribar a resoldre els problemes derivats de la reinnervació motora per axons sensorials i a l'inrevés, però no la manca d'especificitat fascicular. Amb les nostres dades no podem afirmar que no s'estiguin expressant fenòmens de reinnervació motora i sensorial preferent ni l'existència de fenòmens d'eliminació selectiva de col·laterals errònies. De fet l'eliminació de col·laterals aberrants, que s'ha demostrat en motoneurons que reinnerven dianes sensorials (Brushart et al 1993) però no per a neurones sensorials que reinnerven equivocadament dianes musculars (Madison et al 1996), té lloc a partir de les 3 setmanes i assoleix el seu màxim als 90 dies posteriors a la lesió en el model de nervi femoral. A nivell funcional s'ha descrit l'eliminació selectiva de les col·laterals aberrants de

motoneurons del nervi ciàtic que projectaven simultàniament sobre músculs extensors i flexors en un termini no inferior als 16 mesos després de la lesió (Hennig i Dietrichs 1994), temps que ultrapassa de llarg els 3 mesos de seguiment que hem efectuat en aquest estudi. Ni la reinnervació motora preferent ni la selecció de col·laterals és dependent de la presència de l'òrgan diana i es produeix igualment quan es desconecta els fascicles dels territoris distals, encara que amb menor eficiència (Brushart et al 1993). La reinnervació ràpida de dianes limita la col·lateralització axonal i redueix el grau d'hiperinnervació, en la mesura que la reinnervació de les dianes redueix la producció de factors difusibles per promoure l'elongació axonal (Angelov et al 1996, Streppel et al 1998). En aquest sentit, el contacte precoç dels axons amb el segment distal, que es produeix en lesions de secció reparades per sutura directa, augmentaria la taxa de regeneració, la reinnervació precoç i la proliferació de col·laterals. Els efectes de la tubulització sobre l'especificitat poden ser favorables o desfavorables, doncs, segons la distància interneural, les característiques del material de tubulització i, sobretot, la qualitat de reparacions quirúrgiques. En tot cas, futura recerca en especificitat ha d'aclarir dades contradictòries sobre suposats fenòmens de neurotropisme fascicular i els mecanismes que els fonamenten (Evans et al 1991).

#### *3.4.4. Empelts nerviosos versus tubulització en distàncies interneurals llargues*

Encara que hi ha estudis favorables (Seckel et al 1986) i contraris (Abernethy et al 1992, Zhao et al 1992a) a l'existència de neurotropisme fascicular entre extrems proximals i distals dels nervis tibial i peroneal o de fibres motores respecte de branques motores pures en troncs nerviosos sensorials i motors purs, hi ha poca informació sobre aquest mecanisme en nervis mixtes que compari reparacions tradicionals com l'empelt en distàncies interneurals llargues (Luo i Lu 1996). La reparació per autoempelt del segment de ciàtic ressecat genera una guia que, mantenint l'orientació i posició originals, ha de ser molt adequada per a la reinnervació. D'altra banda, però, l'existència de dos fronts de sutura que generen reacció cicatricial poden alterar, especialment en injerts curts, aquesta estructura ideal (Kim et al 1991, Brushat 1993, Brushart et al 1998). Diversos treballs han demostrat que després d'un empelt un nombre menor de neurones motores aconsegueixen enviar el seu axó a territoris distals adequats que després d'una sutura simple (Brushart 1993, Brushart et al 1998). Per un altre costat, la tubulització evita els problemes derivats de l'alineament esperant en la capacitat dels axons per interpretar correctament suposades senyals tròpiques que li arribin de l'extrem distal (Evans et al 1991, Brushart et al 1993), però al mateix temps, presenta limitacions de les capacitats de regeneració intratubular quan el *gap* és massa llarg (Longo et al 1984, Williams 1983, Butí et al 1996, Butí 1994).

La tubulització fascicular amb una doble guia de silicona aconsegueix la reinnervació més específica de les verificades pels diferents grups. Tant la proporció d'animals amb reinnervació aberrant (1/4 animals) com el grau de reinnervació funcional aberrant són gairebé insignificants (0-10% d'error, 96-100% d'encert). Cal recordar, però, el baix nivell de reinnervació quantitativa que assoleix aquest grup en aquestes condicions (dels 9 animals estudiats només 4 han estat vàlids per a estudiar

l'especificitat), que requereixen la producció de guies fasciculars de dimensions més reduïdes per al model emprat. Per aquest motiu, ha estat exclosa de l'estudi histològic.

L'autoinjert de ciàtic mostra un nombre total de neurones marcades amb traçador superior als grups tubulitzats amb guies simples de silicona o de PLC, fet que indica que manté en millors condicions les motoneurones axotomitzades i que permet la regeneració distal d'un major nombre d'axons. De fet, s'ha descrit una disminució del nombre de neurones (15-20%) marcades per l'aplicació d'un traçador perifèric a través d'un injert respecte d'una secció i sutura i s'ha atribuït a la reinnervació aberrant d'altres fascicles que els marcats o a la no reinnervació (Brushart 1993, Brushart et al 1998). En el nostre cas la disminució de neurones respecte al control és menor, entre el 4 i el 10%. L'empelt (6%) i la tubulització amb PLC (6%) presenten un percentatge significativament més baix que el tub de silicona amb el mateix espai interneural (10%) i, fins i tot, que amb menor espai (grup SIL4). Aquest fet seria explicable en base a que promouen una reinnervació de dianes distals ràpida, que reduiria la col·lateralització i els errors distals. En termes globals s'observa la mateixa tendència a la hiperinnervació del múscul plantar (10-15% de neurones addicionals respecte el control) en els grups SIL8 i INJ8 que ja havíem vist en alguns dels grups de secció. En el grup PLC8 els percentatges globals d'innervació de cada múscul estan més ajustats als patró control i no hi ha signes d'innervació polineuronal. L'empelt genera un volum de reinnervació muscular funcional aberrant (44-53% errors, 73-80% d'encert) que juntament amb la tubulització amb silicona (41-42% d'error i 64-87% d'encert) són més elevats que en el grup PLC8 (25-38% d'errors i 75-86% d'encerts) per a tots els músculs estudiats.

En el model femoral, s'ha descrit en autoempelts ideals un lleuger increment respecte d'una reparació per tall i sutura directa del nombre de projeccions motores al fascicle sensorial (40% vs 33% projeccions incorrectes i 57% vs 59% correctes) (Brushart 1993, Brushart et al 1998). Aquest elevat índex d'aberracions apareix en la reparació per autoempelt en una proporció d'animals en alguns casos inferiors a la resta de lesions i reparacions, pels quals tots els animals mostren alteracions en tots els paràmetres calculats. Aquest fet podria estar reflectint que quan s'aconsegueix posicionar correctament, l'empelt ofereix unes condicions gairebé òptimes per tal que els axons regenerin ràpidament, però que al mateix temps, mínimes modificacions de la seva posició i/o orientació poden afectar dràsticament l'especificitat. Després d'un autoempelt s'observa respecte de la sutura directa una disminució del nombre total de motoneurones que projecten sobre el territori d'estudi, que indica que han reinnervat aberrantment altres dianes o bé que no han aconseguit superar la lesió. També és remarcable un increment del percentatge de neurones sensorials que equivocadament creixen per fascicles motors (Brushart 1993, Brushart et al 1998). Sembla lògic pensar que orientar adequadament un autoempelt, amb dos fronts de sutura i de possibles error, és més complicat que suturar directament els dos extrems nerviosos (Sunderland et al 1991, Brushart 1993, Brushart et al 1998). La interposició d'injerts autòlegs construïts a partir d'altres nervis del cos, en els quals ni l'orientació, ni el nombre de fascicles i tubs endoneurials guarda relació amb l'organització del segment proximal pot tenir efectes encara més perjudicials sobre l'especificitat. Zhao i col·laboradors

(1992b) han comparat en distàncies interneurals curtes (4 mm) en el ciàtic de la rata les diferències entre un empelt autòleg procedent del ciàtic contralateral i un de multifascicular amb segments de nervi sural, concluint que ambdues modalitats d'injert mostren uns nivells de reinnervació aberrant funcional inferiors a la sutura directa, i que l'empelt multifascicular obté paradoxalment millors resultats que el de ciàtic (Zhao et al 1992b). En un estudi més recent, però, el mateix grup ha comparat la reparació d'un *gap* de 10 mm dels nervis peroneal i sural (model motor-sensorial) per empelts múltiples de sural amb una combinació d'injerts i tubulització distal o proximal (Papaloïzos et al 1997). La combinació d'empelts de sural i tubulització del punt de sutura distal ofereix una raó d'innervació motora del peroneal equivalent a la de la reparació per empelts múltiples. La tubulització de l'extrem distal podria oferir avantatges en reparacions per empelts reals en permetre l'expressió de senyals neurotròpics dels fascicles distals envers els axons regeneratius (Papaloïzos et al 1997). Emprant un empelt predegenerat prèviament durant 2-4 setmanes, s'ha demostrat un increment del nombre de projeccions neuronals correctes de motoneurons del nervi femoral al fascicle motor i una disminució de projeccions aberrants sobre el fascicle sensorial respecte a empelts frescos. La predegeneració podria afavorir l'expressió de factors tròfics i ajudaria a eliminar del segment distal molècules inhibidores de la regeneració com la glicoproteïna associada a la mielina (MAG), promovent la col·lateralització, accelerant la regeneració i l'eliminació selectiva de col·laterals (Torigoe i Lundborg 1998, Brushart et al 1998).

Un element a tenir en compte en aquests grups postresecció és l'elevat nivell de poliinnervació detectat (12-34%), superior en els grups d'empelt i tub de silicona que en el de tub de PLC. Aquest fet podria posar de manifest o bé que diverses projeccions axonals reinnerven i activen la mateixa fibra muscular o bé fenòmens d'efapsis. Un dels escassos estudis que han abordat l'especificitat de la reinnervació en *gaps* llargs amb marcatge seqüencial amb FB i DiI, va trobar que en una lesió del ciàtic de 10 mm reparada per tub de silicona, un 31% dels axons originalment del fascicle peroneal que innervaven el múscul tibial anterior reinnervaven la mateixa branca nerviosa als 30 dies de la lesió, mentre que el 70% restant corresponien a axons que o bé no havien regenerat o bé havien reinnervat altres dianes (Rende et al 1991). Aquests elevats nivells d'inespecificitat als 30 dies de la lesió són superiors als del nostre treball pel mateix múscul als 90 dpo. Això suggereix que a mida que progressa amb el temps, la regeneració tendeix a millorar l'especificitat de reinnervació. Altres autors han descrit que en gossos només un 6% d'axons motors reinnerven aberrantment el nervi sural després d'una tubulització amb silicona del nervi tibial deixant una distància interneural de 10 mm (Luo i Lu 1996). Aquesta elevada especificitat ha estat atribuïda als potents efectes de la reinnervació motora preferent (Brushart i Seiler 1987, Brushart 1988, 1993). La tubulització amb PLC origina una innervació altament específica, amb un percentatge d'aberració funcional inferior a l'empelt i un índex de dobles i triples col·laterals sobre dianes musculars diferents inferior al de la tubulització amb silicona. Per explicar aquestes propietats, cal tenir en compte en primer lloc la capacitat i la velocitat de regeneració i reinnervació amb cada tipus de reparació. En distàncies limitants en el ratolí, la regeneració a través de tubs de PLC té lloc significativament més depressa i origina nivells de recuperació superiors que les guies de silicona, tefló, polisulfona o col·lagen

(Navarro et al 1996, Rodríguez et al 1999b). En potenciar la regeneració, la relació entre el nombre d'axons distals al tub i proximals tendeix a normalitzar-se, sent en el ratolí als 4 mesos de seguiment de 0,92 per l'injert i de 0,94 pel tub de PLC (Gómez et al 1996, Rodríguez et al 1999b, 1999b). El tub de silicona manté al final del seguiment un nombre de branques filles per cada axó regenerat superior al del tub de PLC i a l'autoempelt. La qualitat de la reinnervació és probablement el resultat d'un compromís entre una capacitat de col·lateralització que asseguri branques suficients com per reinnervar adequadament el màxim nombre de cèl·lules diana, i un nombre de branques limitat per evitar la sobreinnervació. Diversos autors han assenyalat que la reinnervació ràpida afavoreix l'especificitat i redueix la hiperinnervació muscular (Angelov et al 1996, (Guntinas-Lichius et al 1997, Streppel et al 1998, Brushart et al 1999). Teràpies com els bloquejants dels canals de  $\text{Ca}^{2+}$  (Nimodipina) que acceleren la regeneració distal suprimeixen l'estadi final d'hiperinnervació per motoneurons després de la lesió (Angelov et al 1996). L'ús d'autoempelts predegenerats també accelera la reinnervació i simultàniament incrementa l'especificitat de la reinnervació sensorio-motora del nervi femoral (Brushart et al 1999), mentre que les sutures diferides una setmana (donant lloc a la predegeneració de l'extrem distal) en el nervi facial acceleren la reinnervació de la vibrissa i redueixen el grau d'hiperinnervació (Guntinas-Lichius et al 1997).

En condicions normals, els extrems proximals dels axons regeneren gràcies a processos d'identificació entre glicoproteïnes transmembrana, molècules d'adhesió (N-CAMs), glicoproteïna associada a la mielina (P0) de l'axó i components de la matriu extracel·lular com laminina i tenascina. Els axons són guiats pels processos citoplasmàtics les CS i el seu creixement està sincronitzat amb la progressiva eliminació de les restes cel·lulars del segment distal. Les CS de l'extrem nerviós distal i els òrgans diana secreten un ampli ventall de factors de neurotròpics i neurotròfics (NGF, IGFs, bFGF, BDNF, CNTF) que promouen per diferents mitjans la col·lateralització axonal (Fu i Gordon 1997). La producció de factors neurotròfics per part de les cèl·lules diana és dependent del grau d'innervació funcional correcta. Les fibres musculars encara denervades acumulen gran quantitat d'N-CAMs que mantenen efectes atractius i promotors del creixement i la col·lateralització terminal, afavorint la poliinnervació muscular (Politis et al 1982, Covault i Sanes 1985, Angelov et al 1996). Per a altres funcions, es coneix que els òrgans diana alliberen diferents combinacions de molècules tròfiques i tròfiques segons el seu estat de denervació o innervació (Distefano et al 1992, Munson et al 1997, Mendell et al 1999, McAllister et al 1999). Recentment s'ha relacionat l'increment de l'expressió en models transgènics de GDNF (factor neurotròfic derivat de cèl·lules glials) en fibres musculars com un factor promotor de la hiperinnervació i poliinnervació musculars, efectes que no produeixen els increments de NT-3 ni NT-4 (Nguyen et al 1998). En tot cas, l'acceleració de la reinnervació i la promoció d'una reconexió perifèrica específica podria reduir parcialment la secreció de molècules tròfiques i de retruc la hiperinnervació de dianes (Angelov et al 1996).

### 3.5. Especificitat de la reinnervació de diferents tipus de fibres i òrgans diana

De manera general i independentment del tipus de lesió infringida, l'especificitat de la reinnervació mostra en la majoria de grups experimentals estudiats quatre aspectes interessants: les funcions mediades per fibres primes no presenten nivells més elevats d'aberracions funcionals de la reinnervació que les gruixudes, en la reinnervació muscular la reinnervació aberrant del múscul tibial anterior és sempre superior al del múscul gastrocnemi, s'observa freqüentment la hiperinnervació de les dianes més distals, i predominen les dobles innervacions de músculs antagonistes i preferentment del múscul tibial anterior i gastrocnemi.

#### 3.5.1. Especificitat de la reinnervació per diferents tipus de fibres

Les nostres dades no semblen indicar que cap tipus funcional de fibra nerviosa tingui major o menor capacitat de reinnervar a través de fascicles no corresponents dianes perifèriques. Les fibres de petit diàmetre, bàsicament sensorials primes i simpàtiques, mostren una major capacitat regenerativa, una reinnervació precoç i nivells finals de recuperació respecte dels valors preoperatoris superiors als de les fibres mielíniques gruixudes, motores i sensorial. La majoria de treballs han justificat aquesta expansivitat gràcies a la major capacitat de col·lateralització terminal dels axons primis respecte dels gruixuts (Kinnman i Aldskogius 1986, Kinnman et al 1992). Ara bé, la capacitat de les branques col·laterals per aconseguir una reinnervació funcional fora dels seus límits és quasi exclusiva de les fibres primes, de manera que després d'una secció nerviosa reparada per sutura s'observa una expansió funcional de terminacions lliures que actuen com a nociceptors polimodals i per contra escasses modificacions dels territoris de mecanoreceptors de baix llindar reinnervats per fibres gruixudes (Devor et al 1979, Navarro et al 1988, Povlsen et al 1993, Wiesenfeld-Hallin et al 1988, 1989). El nostre estudi assenyala que els axons sudomotors, amielínics, amb una distribució regional clara per fascicles, presenten un grau de reinnervació funcional a través del fascicle corresponent i no corresponent equivalent a la dels axons motors mielínics. A diferència d'aquests, però, crida l'atenció que s'incrementa de manera especial en alguns dels grups (compressió, tall i sutura i tubulització amb PLC) el grau de poliinnervació glandular que de fet és constitutiva per alguns dels coixinets plantars. Aquesta hiperinnervació glandular que es produeix per axons originals del nervi tibial i sural conduïts després de la lesió a través dels fascicles peroneal, tibial i sural, afecta a la gran majoria de GS de cadascun dels coixinets i dits. És probable que el nostre disseny destinat a estudiar l'especificitat fascicular sobre els territoris de distribució no sigui sensible al gran nombre d'aberracions de la reinnervació que afecten més aviat la distribució regional d'axons d'un mateix territori o la càrrega d'innervació múltiple de dianes específiques no per axons de diferents fascicles, sinó per fibres a través de la mateixa branca. L'especificitat de la reinnervació hauria de garantir per a determinats tipus de funcions no només que les fibres reinnervin a través del seu fascicle una diana tissularment adequada del territori corresponent, sinó també òrgans específics per tal d'evitar les alteracions de localització d'estímul sensorials (fibres A $\beta$ , A $\delta$ ) o de la coordinació i el desenvolupament dels moviments (fibres A $\alpha$ ) per posar alguns exemples (Kimura et al 1975, Montserrat i Benito 1988, Sumner 1990). Ara bé, les conseqüències funcionals globals de modificacions en els territoris de

sudoració o nocicepció, sempre i quan es garantitzi un nivell mínim de quantitat de reinnervació territorial, no són massa transcendents per al desenvolupament de les seves funcions (Navarro et al 1994). Els reflexos de retirada són respostes integrades espinalment amb un component nociceptiu mediat per fibres C (els components Ab i Ad participen de funcions més complexes) que té la funció d'evitar la lesió tissular. La localització específica i precisa de l'estímul dolorós no modificarà la resposta que serà de retirada de tota l'extremitat; així la funció està garantitzada en la mesura que hi ha terminacions lliures nociceptives que es distribueixen per tot el territori sense deixar àrees d'anestèsia o analgèsia. L'activació de les GS és fonamental per a la termoregulació en diferents condicions, ara bé el desenvolupament d'aquesta funció autonòmica no es modifica significativament per alteracions en els fascicles que condueixen els axons sudomotors cap a les glàndules o dels territoris de sudoració de cada nervi, sempre i quan un nombre significatiu de GS estigui innervada i sigui funcional (Vilches 1997). La gran capacitat de ramificació terminal de fibres C nociceptives (Wiesenfeld-Hallin et al 1988, 1989, Povlsen et al 1993) i autonòmiques (Kennedy i Sakuta 1984, Kennedy et al 1988, Navarro i Kennedy 1988), fins i tot en absència de lesió, garanteix en la majoria de casos la reinnervació necessària i distribuïda per al desenvolupament de la funció.

### 3.5.2. Aberracions de la reinnervació motora

En acord amb d'altres treballs, les aberracions de la innervació motora no afecten per igual tots els territoris musculars, sinó que el percentatge de projeccions incorrectes procedents del nervi tibial sobre el múscul tibial anterior és en general superior al de projeccions del peroneal cap al múscul plantar o el gastrocnemi. Aquesta mateixa observació ha estat feta en estudis realitzats en tubs en "Y" *in vivo* (Politis i Steiss 1985, Zhao et al 1992a, 1992b, 1992c) o després de reparacions de seccions per injert i tubulització (Evans et al 1991). Fins i tot estudis contraris a l'existència d'una especificitat fascicular demostren una major preferència del tibial que del peroneal pel seu extrem distal corresponent (Abernethy et 1992). Alguns treballs han acabat conclouent que la suposada especificitat fascicular no actua quan es posen en competència axons del fascicle tibial i peroneal per als seus respectius extrems distals (Evans et al 1991, Zhao et al 1992a). Quan es posen en competició dos fascicles (tibial-peroneal) amb un nombre desigual d'axons mielínics i amielínics i un extrem distal amb una àrea de secció diferent, sembla que independentment de possibles factors d'identificació molecular o factors difusibles emesos per la diana (Politis et al 1992), la probabilitat que un axó reinnervi el fascicle amb major àrea de secció és més elevada. Al mateix temps, el fascicle de calibre més gran tindrà més tendència a la reinnervació correcta del seu extrem distal però també aberrant per axons del fascicle menor (Evans et al 1991, Angelov et al 1993). Totes aquestes variables mecàniques poden quedar modulades pel tipus de reparació (sutura directa, injert o tubulització) i l'acurada coaptació fascicular (Evans et al 1991, Brushart 1993, Brushart et al 1998), el grau de ramificació axonal (Brushart et al 1998), la velocitat de regeneració de diferents tipus de fibres, o l'existència de fenòmens d'innervació motora (Brushart i Seiler 1987, Brushart 1988) i sensorial (Madison et al 1996) preferent. Després de lesions del ciàtic i suposant que els dos fascicles principals (tibial i peroneal) presentin un nivell de col·lateralització semblant, la probabilitat que el múscul tibial anterior rebi més projeccions aberrants del fascicle tibial que el

múscul gastrocnemi del peroneal està condicionada pel fet que el tibial conté 17.000 axons i el peroneal 7.200 (un 42% menys) (Schmalbruch 1986). Tot i això, les nostres dades histològiques no mostren que el múscul tibial anterior, ni el gastrocnemi pateixin hiperinnervació. El múscul accepta tant la innervació correcta com l'aberrant, de manera que als 90 dpo el nombre de motoneurons correctes i incorrectes no superi amb escreix el valor normal. D'altra banda, com a resultat del procés regeneratiu, el múscul tibial anterior mostra nivells de poliinnervació muscular superiors als del múscul gastrocnemi. L'observació inversa que es deriva de les nostres dades, segons la qual el percentatge d'innervació funcional correcta és superior (sense diferències significatives) pel múscul gastrocnemi que pel múscul tibial anterior és més difícil de justificar. D'una banda la diferència de l'àrea de secció fascicular ( $166 \text{ mm}^2$  del tibial vs  $73 \text{ mm}^2$  del peroneal) facilitaria l'entrada dels axons del cap proximal del tibial al seu extrem distal, més que no pas l'elongació dels axons del peroneal pel seu fascicle cap al múscul tibial anterior. Al mateix temps però, les diferències en l'àrea de secció i en nombre de tubs endoneurials també afavoririen l'entrada d'axons aberrants del peroneal al fascicle tibial. Alguns autors han justificat la hiperinnervació de territoris musculars per un nombre reduït d'axons a través d'un extrem distal de gran diàmetre gràcies a la potència de l'efecte tròfic d'un nombre excessiu de tubs endoneurials degenerats (Angelov et al 1993). No es pot descartar que la reinnervació de l'extrem distal del tibial per axons del seu fascicle es produeixi "preferentment", segons alguns autors per afinitats específiques (Politis et 1984, Politis i Steiss 1985) o simplement per l'alineament, més ràpidament i abans que els axons del peroneal hagin pogut ocupar un tub endoneurial aquest es trobarien ja tots ocupats, mentre que inversament, la pressió exercida per un contingent d'axons del tibial molt superior als reinnervats del peroneal aconseguixi superar el pes de l'afinitat pel fascicle. La selectivitat entre fascicles sembla ser un procés simultani a l'elongació axonal i dependent del grau de regeneració, de manera que mentre el nervi tibial mostra des del primer moment una selectivitat pel seu fascicle distal, el peroneal comença a expressar-la més tardanament (Zhao et al 1992a). En tot cas, si les possibilitats de reinnervació aberrant fossin absolutament equivalents des del punt de vista percentual, el nombre absolut d'axons del fascicle tibial al peroneal sempre seria superior als del peroneal al tibial i, per tant, una vegada arribats al múscul les probabilitats d'establir connexions aberrants funcionals serien també superiors. L'eliminació selectiva de col·laterals úniques o dobles aberrants té lloc de manera tardana, entre els 16 i 24 mesos després de la lesió (Hennig i Dietrichs 1994).

Les dades, també mostren de manera general, una tendència a la hiperinnervació de dianes distals per axons equivocats o de neurones amb dobles projeccions especialment important al grup de sutura (23%) i tubulització amb silicona (15%). D'una banda, s'esperaria una reducció del nombre de col·laterals disponibles a mesura que el trajecte es va fent més distal (Jenq i Coggeshall 1985, Madison et al 1996). D'altra, les dianes distals són les darreres a reinnervar-se i per tant durant la denervació poden alliberar més factors tròfics i tròpics que promouen l'atracció axonal i la col·lateralització terminal (Angelov et al 1996). En el model del nervi femoral, les neurones motores i sensorials que no reinnerven el seu fascicle distal corresponent són més nombroses en lesions proximals que en les distals, properes al punt de bifurcació del tronc principal en la branca sensorial

i la motora. És bàsicament en el punt de lesió en el qual la unitat regenerativa prolifera àmpliament i mostra un substrat d'axons superiors per a la reinnervació aberrant (Madison et al 1996). La hiperinnervació per axons de fascicles diferents del nervi plantar encarregat de la separació dels dits durant la deambulació pot produir la contracció incompleta dels músculs intrínsecs i la barreja de senyals activadore conduïts pel nervi tibial i senyals inhibidors pels axons peroneals, que comporti el bloqueig del moviment i la pèrdua de base de sustentació de les extremitats i l'hemicòs posterior. Al mateix temps la innervació aberrant d'aquesta diana produirà la seva activació en fases de la marxa en la qual no hi ha contacte de la planta amb el sòl i a l'inrevés (Angelov et al 1993). El predomini de dobles projeccions entre músculs proximals i antagonistes i la poliinnervació de llurs fibres musculars produirà l'activació simultània de músculs amb accions oposades i el bloqueig del moviment (Montserrat i Benito 1988, Valls-Solé et al 1992, Angelov et al 1999). Donat l'elevat nivell de reinnervació errònia tant en músculs proximals com distals, no sembla que als 90 dpo, segons els nostres estudis, s'hagin donat mecanismes de selecció de col·laterals aberrants. En tot cas, si s'han començat a produir, no comporten canvis funcionals detectables. Caldria fer estudis comparatius a llarg (6-12 mesos) i curt termini (1,5 mesos) per avaluar si en el nostre model es produeix un refinament de la qualitat de la reinnervació. Les observacions realitzades en alguns animals seguits fins a 6 mesos és que no hi ha canvis significatius en el nivell d'inespecificitat, raó per la qual sembla que l'expressió funcional d'una possible eliminació selectiva de col·laterals tindria lloc a molt llarg terme (Hennig i Dietrichs 1994).

### *3.5.3. Especificitat de la reinnervació sensorial*

No hi ha massa estudis que hagin abordat les alteracions en l'especificitat fascicular o territorial de la reinnervació de fibres sensorials gruixudes, encarregades de recollir la sensibilitat mecanorreceptiva. L'absència d'un mapa clar de projeccions centrals ganglionars (Prats-Galino et al 1999) i perifèriques per a nervis com els digitals, que mostren en animals controls una innervació múltiple per axons dels fascicles tibial, peroneal i sural, així com la variabilitat interindividual dificulten l'avaluació dels canvis que produeix la lesió. Al mateix temps, al tractar-se de dianes molt allunyades del punt de lesió, la proporció d'animals que recuperen, especialment després de lesions de resecció, una certa amplitud del PANC digital és baixa, fet que incrementa la variabilitat i limita la representativitat de la mostra. Diversos estudis han determinat que els axons sensorials tenen menor capacitat per reinnervar els seus fascicles i territoris corresponents i que generen més aberracions de la reinnervació que els motors (Brushart 1988, Madison et al 1995). Les nostres dades, indiquen que els grups amb lesions de resecció presenten una reinnervació menys específica que els grups de secció. En tot cas, després de lesions, el 4t i el 5è dit deixen de rebre axons del nervi sural, fet que posa de manifest, en contra de les observacions en gossos (Luo i Lu 1996), la dificultat per reintroduir-se des de l'extrem proximal del ciàtic en un fascicle de petit calibre (20,5 mm<sup>2</sup>). En els tres nervis digitals estudiats s'observa un increment de la proporció d'animals amb reinnervació pura d'axons exclusivament del tibial, perdent així el patró d'innervació mixta (tibial-peroneal) que era la majoritària al 4t nervi digital i important en el 5è i el 2n. Pels animals que restableixen una innervació

múltiple (tibial-peroneal) s'observa una contribució majoritària d'axons del fascicle tibial en els nervis digitals del 4t i 2n dits, mentre que en el 5è dit s'incrementa l'aportació del peroneal. En tot cas, la nostra aproximació experimental no aborda el problema de les alteracions de la localització sensorial que és el fonamental per aquesta funció. Que els axons sensorials gruixuts regenerin pel seu fascicle original no garantitza que posteriorment reinnervin la mateixa subàrea cutània que tenien originalment, i per tant és difícil que es recuperi adequadament la percepció de la intensitat, la qualitat i la localització dels diferents estímuls.

### **3.6. Mecanismes reguladors de la capacitat de reinnervació específica**

Els mecanismes d'especificitat que regulen la reinnervació selectiva de dianes musculars, sensorials i autonòmiques en troncs nerviosos plurifasciculars i mixtes estan condicionats per una multiplicitat de variables: (a) l'organització fascicular dels extrems proximals i distals, (b) aspectes mecànics i quirúrgics de la lesió i la reparació (Evans et al 1991, Zhao et al 1992b), (c) trajectòria i nombre de branques tributàries de l'extrem distal (Sumner 1990, Madison et al 1996), (d) capacitat de col·lateralització, (e) acció del neurotropisme fascicular o d'òrgan diana (Politis et al 1982, 1985, Politis i Spencer 1983, Politis i Steiss 1985, Politis 1985, Doolabh et al 1996), (f) innervació motora i sensorial preferent (Brushart et al 1988, 1990, 1993, Brushart et al 1998, Madison et al 1996) i eliminació selectiva de col·laterals (Brushart 1993, 1996, Hennig i Dietrichs 1994, Brushart et al 1998), (g) hiperinnervació (Angelov et al 1993, Kuiken et al 1995) i poliinnervació de dianes (Bernstein i Guth 1961, Letinsky et al 1976, Gerding et al 1977, Kuiken et al 1995), (h) mecanismes d'efapsis (Sadjadpour 1975, Montserrat i Benito 1988, 1990), (i) modificacions de l'excitabilitat i el reclutament d'unitats motores (Valls-Solé et al 1992, Angelov et al 1999, Cossu et al 1999), i (j) senyals moleculars que regulen les interaccions entre els axons regeneratius, les cèl·lules glials, la membrana basal i els seus òrgans diana (Tessier-Lavigne i Goodman 1996, Nieto 1996, Fu i Gordon 1997).

L'anàlisi parcial en models específics per cadascun d'aquests elements permet aprofundir en el coneixement del seu funcionament i regulació. En qualsevol cas, en un model de lesió real que impliqui nervis mixtes amb multiplicitat de fascicles, tots aquests condicionants entraran en joc de tal manera que l'efectivitat d'alguns dels mecanismes descrits poden quedar potenciats o disminuïts per l'acció de la resta.

#### **3.6.1. Organització fascicular**

La dificultat per aconseguir una reinnervació específica depèn del nombre de fascicles i d'axons que entren en competició per regenerar fins a les seves dianes perifèriques. Com més gran és el nombre de fascicles i el nombre i la varietat d'axons de cadascun d'ells més problemàtica serà la reinnervació adequada. Els fascicles amb una elevada àrea de secció i un major nombre de tubs endoneurials són segments distals més fàcilment reinnervables que els de superfície reduïda, a més constitueixen un estimul tròfic superior pels axons regeneratius que els segments distals de petit diàmetre (Angelov et

al 1993). Al mateix temps els fascicles proximals amb un nombre més gran d'axons tindran més capacitat per prolongar un contingent nombrós d'axons al fascicle distal correcte. L'orientació dels diferents fascicles en el seu punt de separació també condiciona la probabilitat d'un axó que regenera prengui una determinada trajectòria. D'aquesta manera, en el model del nervi ciàtic, el fascicle tibial mostra per diàmetre, orientació i nombre d'axons una major probabilitat a ser reinnervat per un nombre gran d'axons del seu propi origen (reinnervació específica), encara que també per d'altres de no corresponents que li arribin (reinnervació aberrant) (Evans et al 1991, Zhao et al 1992b). La reinnervació específica en segments distals de fascicles de tamany reduït es més difícil en la mesura que un petit contingent d'axons adequats ha de competir amb una gran població de possibles erronis per ocupar un nombre reduït de tubs endoneurials (Evans et al 1991). Treballs que comparen la reinnervació en tubs en "Y", en els quals un únic fascicle proximal ha d'escollir entre dos extrems distals, o en tubs en "X", en els quals entren en competició dos extrems proximal per dos extrems distals, mostren en aquests segons un gran de selectivitat fascicular molt menor (Zhao et al 1992c).

### 3.6.2. Trajectòria i nombre de nervis tributaris

Les lesions produïdes en regions proximals, allunyades de les dianes distals, originen nivells més elevats de reinnervació aberrant que les més distals (Madison et al 1996). El nombre de branques tributàries que abandonen el tronc principal al llarg del seu recorregut i la seva orientació de sortida condicionen la probabilitat que un axo regeneratiu arribi a innervar correctament el seu fascicle (Brushart et al 1988). En aquest treball, a diferència d'altres que han optat per lesions més selectives d'algunes branques o de nervis amb poques ramificacions (Brushart et al 1988, Luo i Liu 1996), s'ha realitzat una transecció proximal del nervi ciàtic entre 5 i 10 mm abans de la seva trifurcació. Per sota del punt de lesió, l'axó regeneratiu pot optar d'entrada entre tres possibles fascicles (tibial, peroneal i sural) de diferent diàmetre i tots ells mixtes (motors, sensorials i autonòmics). El tibial dóna tres branques motores que, a la vegada, originen al llarg del seu trajecte descendent; la primera tres divisions (al gastrocnemi lateral, solí, i plantars), la segona una única branca (gastrocnemi medial) i la tercera tres branques (tibial posterior, flexors del 1r dit i flexor llarg dels dits). Posteriorment continua fins al turmell on dóna lloc a dues branques terminals mixtes, els nervis plantar lateral i medial. El fascicle peroneal comú es divideix en dues branques terminals: la superficial o músculocutània que dóna successivament dues branques musculars (peroneal lateral llarg i curt) i finalment cinc branques terminals al dits de la pota, i la profunda que presenta tres derivacions musculars successives (tibial anterior, extensor llarg dels dits i extensor curt del 2n dit) fins arribar a la regió dorsal interna. Finalment, el sural dóna en el seu trajecte descendent una branca sensorial lateral (zona lateral de la cama fins al 3r dit), una branca mixta per a la regió lateral externa del peu (músculs abductor i flexor curts del 5è dit i pell lateral dorsal) i una branca sensorial sobre el turmell i el taló. Cada divisió terminal determina una probabilitat de l'axó de regenerar per un dels fascicles, que depèn del diàmetre o nombre de tubs endoneurals de cadascuna d'elles ( $p = (1/n^\circ \text{ de branques terminals}) \times \text{percentatge de l'àrea de secció}$ ). Cada branca al llarg de trajecte d'un fascicle determina una probabilitat ( $p = (1/2) \times \text{percentatge de l'àrea de secció}$ ) que l'axó prengui la col·lateral o continui pel tronc principal, de tal manera que per qüestió de diàmetres i, a més, d'orientació angular la

probabilitat de continuar per la via principal és més gran que la de situar-se en la derivació. Així la probabilitat que un axó del tronc del ciàtic opti en el punt de trifurcació pel fascicle tibial seria del 64%, pel peroneal un 28% i pel sural d'un 8%. Multiplicant successivament les probabilitats de pendre la derivació correcta en cada punt de divisió fins a l'òrgan diana desitjat, es podria establir la probabilitat que a l'atzar un axó, regit exclusivament per factors mecànics i sense tenir en compte les interaccions amb d'altres fibres veïnes, aconsegueixi reinnervar la seva diana original.

### 3.6.3. *Reparació quirúrgica*

L'enfrontament directe dels dos extrems neurals per sutura directa pot tenir resultats oposats sobre l'especificitat, en funció de la qualitat de l'alineament que s'aconsegueixi. La quantitat i la qualitat de la reinnervació assolits després de la sutura directa ben orientada dels extrems és superior a la de qualsevol altra tècnica de reparació després d'una transecció (Evans et al 1991, Zhao et al 1992b). Per contra, davant del risc d'una sutura mal alineada és preferible optar per la tubulització, que encara que disminueix lleugerament la quantitat de reinnervació, dona espai suficient com per que s'expressin els possibles efectes neurotròpics dels fascicles i els òrgans diana (Evans et al 1991, Zhao et al 1992b). En distàncies interneurals curtes en la rata, l'efectivitat de la tubulització no depèn de la bona o mala orientació dels extrems proximals ni distals, mentre que la sutura creuada iatrogènica té efectes desastrosos tant sobre la quantitat com sobre la qualitat de la recuperació (Evans et al 1991). En espais interneurals llargs, menys estudiades respecte a l'especificitat de la reinnervació, sembla que la potència d'alguns mecanismes neurotròpics es perden amb la distància, a més del fet que estan condicionats per una regeneració quantitativament menor. En aquest cas, qualsevol procediment que garantitzi una regeneració ràpida i limiti l'excessiu grau de col·lateralització terminal afavoreix l'especificitat de la reinnervació perifèrica. La tubulització amb materials reabsorbibles i permeables o l'empelt fresc o predegenerat són solucions adequades (Zhao et al 1992b, Brushart et al 1998). En el nostre estudi el tub de PLC ofereix resultats d'especificitat superiors als d'un autoempelt de nervi ciàtic.

### 3.6.4. *Capacitat de col·lateralització*

En la zona de lesió els axons emeten nombroses (50-100) branques col·laterals amb el seu con de creixement, de les quals una minoria s'elongaran distalment (Ramon y Cajal 1928, Fu i Gordon 1997). La relació d'axons regenerats distalment se situa entre 1,4-1,7 axons mielínics per cada axó proximal al punt de lesió (Jenq i Coggeshall 1984, 1985, Mackinnon et al 1991). El nombre de col·laterals mielíniques distals a la lesió s'incrementa en les primeres fases de la regeneració fins a un 40-70% en lesions de secció i resecció i arriba al seu màxim entre els 2 i 4 mesos, disminuint progressivament fins a normalitzar-se cap als 24 mesos posteriors a la lesió (Jenq i Coggeshall 1985, Mackinnon et al 1991). Pels axons amielínics la relació distal-proximal mostra després de resseccions un descens inicial, produït en part per la mortalitat neuronal i una recuperació de relacions properes a 1 als 8 mesos. El tipus de lesió i la reparació utilitzada influeixen el nivell de ramificació axonal (Jenq i Coggeshall 1985, Gómez et al 1996). L'increment del nombre de col·laterals no és exclusiu de segments distals propers a la lesió. Diferents autors han descrit un increment a les

8 setmanes d'entre 32-57% respecte els valors control del nombre d'axons mielínics i amielínics en branques distals tributàries del ciàtic lesionat, que es mantenen realtivament estables als 8 mesos de la lesió. En fascicles distals i sensorials com els nervis digitals, s'obseven per contra pèrdues entre 35-58% del nombre d'axons mielínics i amielínics respecte el control (Jenq i Coggeshall 1985, 1986) que posen de manifest una reducció de la capacitat de regeneració en branques llunyanes del punt de lesió.

Tots aquells elements que promoguin la col·lateralització dels axons incremeten la probabilitat que alguna de les seves branques reinnervi adequadament la seva diana (Brushart 1988, 1990). Al mateix temps, però, incrementa també el nombre de tubs endoneurials ocupats per col·laterals aberrants, el nombre d'axons de regeneració tardana que no troben els seus tubs ja ocupats per col·laterals errònies, el nombre de motoneurons amb múltiples projeccions a diferents dianes i la poliinnervació i la hiperinnervació de cèl·lules o òrgans diana (Angelov et al 1993, 1996, 1999). Tenint en compte aquests esdeveniments, es pot recalcular la probabilitat d'innervació específica per part d'un axó tenint en compte la relació entre el contingent d'axons que entren en competència i del nombre de tubs endoneurals disponibles als respectius fascicles distals (Madison et al 1996). La probabilitat que un axó reinnervi el tub endoneural d'un fascicle determinat és equivalent al quocient entre el nombre de tubs endoneurals de fibres mielíniques disponibles en cada fascicle (tibial: 4.500 peroneal: 1.900 i sural: 1.050) i el nombre total d'axons mielínics en reinnervació (7.800). Si la reinnervació es produeix a l'atzar, la probabilitat d'una axó mielínic d'innervar un tub endoneural del fascicle tibial serien del 57%, del peroneal un 24% i un 13% pel sural. La col·lateralització incrementa el denominador i per tant disminueix les probabilitats de cada axó individual. Si es considera un índex de col·lateralització entre 1,4 i 1,7, la població d'axons mielínics regenerants s'incrementa fins a 10.920-13.260 i les probabilitats es redueixen a 34-41% pel tibial, 17-14% pel peroneal i 8-10% pel sural. Coneixent el nombre de tubs endoneurials disponibles en cada punt de divisió i el nombre d'axons regenerants, que disminueix a mida que una part va innervant dianes més proximals, es podria multiplicar les probabilitats calculades en cada punt de derivació per obtenir la probabilitat d'efectuar sense errors un determinat trajecte fins l'òrgan diana específic.

### 3.6.5. *Neurotropisme fascicular*

Una gran quantitat de treballs han defensat l'existència d'una especificitat fascicular entre els extrems proximals i distal dels nervis tibial i peroneal del ciàtic. En tubs en "Y" els fascicles tibial i peroneal projecten als seus respectius segments distals un nombre majoritari d'axons, encara que en cada cas es quantifica entre un 20 i un 40% d'errors de reinnervació fascicular, superiors pel fascicle tibial que pel peroneal (Politis et al 1982, Politis i Spencer 1983, Politis i Steiss 1985). Mentre alguns autors han demostrat la necessitat de la connexió dels fascicles als òrgans diana per verificar aquesta reinnervació fascicular preferent (Zhao et al 1992b), d'altres han conclòs que el fascicle en si mateix té capacitat per produir-la (Politis i Steiss 1985). L'especificitat fascicular es produeix de manera progressiva, probablement per eliminació o retracció de col·laterals incorrectes (Zhao et al 1992b). La reinnervació fascicular mostra però unes grans dificultats quan s'inverteix la posició distal dels

fascicles tibial i peroneal als extrems del tub en "Y" (Politis 1985), o s'han posat en competició en tubs en "X" axons proximals dels fascicles tibial i peroneal a la vegada (Zhao et al 1992c). Els neurotropisme fascicular hauria de ser universal per a tota mena de fascicles mixtes, però els estudis *in vivo* mostren resultats d'especificitat millors pel nervi tibial que pel peroneal (Politis i Steiss 1985, Evans et al 1991, Zhao et al 1992a, 1992b, 1992c). Altres resultats desmenteixen l'existència de l'especificitat fascicular (Abernethy et al 1992, Bernstein i Guth 1961). Invertint la posició del tub en "Y", els axons del tibial i del peroneal tenen similar capacitat per reinnervar músculs corresponents i no corresponents de manera funcional i estable (Weiss i Hoag 1946). Les nostres dades no permeten descartar l'existència d'un neurotropisme fascicular o d'òrgan diana. Als 90 dpo i per a totes les lesions, el percentatge de reinnervació funcional aberrant és inferior al de projeccions correctes, de manera que qualsevol model probabilístic donaria als axons unes probabilitats de reinnervació específica inferiors a les trobades. Caldria estudiar amb profunditat les relacions de competència i cooperació, adhesió o repulsió d'axons regeneratius del mateix i diferents fascicles en la reinnervació del seu extrem distal corresponent a nivell del mateix tronc nerviós.

### 3.6.6. Innervació motora i sensorial preferent i eliminació selectiva de col·laterals

Hi ha tota una línia de treballs que confimen l'existència d'una innervació preferencial motora-sensorial. En un model més simple de nervi mixte com el femoral (3.085 axons mielínics) amb dues branques terminals, una muscular pura pel múscul quàdriceps (1.250 axons mielínics) i l'altra sensorial (1.672 axons mielínics), s'ha demostrat la reinnervació preferent, que no absoluta, de la branca muscular per axons motors (Brushart i Seiler 1987, Brushart et al 1988, 1990, 1993, Brushart et al 1998) i la sensorial per axons sensorials (Brushart et al 1988, Madison et al 1996). Aquest fenomen es produeix amb més intensitat en animals joves que en adults i independentment de la interposició o no d'una petita distància interneural (Brushart 1988). També té lloc quan els extrems distals estan desconnectats de les seves dianes o s'inverteix la posició dels extrems distal cutani i muscular, encara que amb menor eficàcia (Brushart 1993). Malgrat que no s'ha assajat en models de tubulització en distàncies interneurals curtes i llargues, la innervació preferent té lloc en lesions i reparacions de compressió (Brushart et al 1998), secció i sutura, tubulització amb *gaps* de 0,5 mm, empelts autòlegs (Brushart et al 1993, Madison et al 1996) i empelts predegenerats (Brushart et al 1998). El mecanisme d'especificitat es produeix gràcies a l'eliminació selectiva de col·laterals axonals que regeneren per un fascicle equivocat cap a dianes tissulars no apropiades. El *prunning* de col·laterals motores que reinnerven el fascicle sensorial té lloc a partir de les 3 setmanes i s'estabilitza als 2 mesos en aquest model (Brushart et al 1990). No s'ha estudiat si la innervació sensorial preferent respon a un model semblant, però en tot cas genera una qualitat de reinnervació superior a la que seria esperable si el fenomen es produís a l'atzar (Madison et al 1996). Els nostres estudis han estat realitzats sobre tres fascicles que contenen en diferents proporcions axons motors, sensorials i autonòmics a la vegada. En tot cas pels dos principals, tibial i peroneal, no podem descartar que la reinnervació motora i sensorial preferent siguin les causants del grau d'encert, superior al d'error assolit al nostre estudi. Als 90 dies postoperatoris, el percentatge de neurones amb dobles projeccions musculars se situa entre 2,5-10%, valors equivalents o inferiors als obtinguts en lesions

similars del nervi femoral (Brushart 1990, 1993) i del facial (Angelov et al 1999) al mateix període. És probable que mecanismes d'eliminació selectiva de col·laterals s'hagin pogut començar a produir en aquest període de temps, com a mínim en els grups amb reinnervació més ràpida que són els que presenten els nivells de reinnervació aberrant més elevats. D'altra banda, però, el percentatge de reinnervació funcional aberrant per poliinnervació i hiperinnervació d'alguns músculs es manté elevat, fet que fa pensar que els mecanismes de *pruning* per a col·laterals que reinnerven dianes *tissularment* no corresponents són ràpids i eficaços, mentre que són lents o dependents de l'activitat aquells que permetrien seleccionar les col·laterals que han reinnervat aberrantment un òrgan *tissularment* anàleg a l'original però amb una contribució funcional diferent (per exemple, múscul tibial anterior *versus* múscul gastrocnemi). L'eliminació selectiva de projeccions axonals aberrants en un model de nervi plurifascicular i mixt s'ha demostrat entre 1 i 2 anys de la secció i sutura del nervi ciàtic en neurones amb múltiples projeccions sobre grups musculars funcionalment antagonistes (Hennig i Dietrichs 1994).

### 3.6.7. Hiperinnervació i poliinnervació de dianes

Un dels efectes de la reinnervació després de lesions que produeixen una gran col·lateralització axonal en distàncies curtes o intermitges és la innervació d'òrgans diana per un nombre de terminals superior a l'original. Aquesta hiperinnervació indica que neurones que originalment innervaven altres dianes ara envien el seu únic axó o alguna de les seves branques sobre altres òrgans perifèrics que reben al mateix temps projeccions de llurs neurones originals o d'altres (Angelov et al 1993, 1996). La hiperinnervació comença a produir-se a partir del primer mes de reinnervació i continua de manera progressiva fins establir-se a l'entorn dels 4 mesos posteriors a la lesió, sense mostrar al llarg d'aquest període tendència a reduir-se (Angelov et al 1993, 1996, 1999, Streppel 1998). En el nostre estudi, la hiperinnervació afecta de manera especial les dianes distals (múscul plantar) a nivells que, segons el grup, oscil·len en valors màxims d'entre 7-26%. Els músculs proximals mostren als tres mesos un volum de projeccions, encara que algunes d'aberrants, semblant a l'original.

Al mateix temps, la hiperinnervació pot induir fenòmens de poliinnervació, que consisteixen en l'establiment de sinapsis amb una mateixa diana (fibra muscular o glàndula sudorípara) per diversos axons a la vegada, que poden correspondre a branques d'una mateixa neurona o de diferents neurones, d'un mateix fascicle o de diferents fascicles (Bernstein i Guth 1961, Letinsky et al 1975, Gerding et al 1977, Gorio et al 1983, Kennedy i Sakuta 1984, Kuiken et al 1995). Els músculs d'animals neonatals mostren una poliinnervació per diferents axons que té tendència a reduir-se fins a desaparèixer entre els 10-15 dies d'edat, un procés mediat per increments transitoris de la concentració de  $\text{Ca}^{2+}$  en la fibra muscular (Zhu i Vrbová 1992). En adults, s'ha observat la capacitat de segments nerviosos implantats directament sobre la massa muscular de generar sinapsis funcionals supernumeràries a la placa motora i al seu entorn (Gerding et al 1977, Kuiken et al 1995). En el cas de la innervació simpàtica sudomotora, la poliinnervació de les GS es manté durant la vida adulta, encara que es redueix amb l'envelliment (Kennedy i Sakuta 1984, Navarro i Kennedy 1990b). S'han observat també fenòmens de poliinnervació després de la lesió de nervis perifèrics per compressions

(Letinsky et al 1976, Gorio et al 1983) o seccions reparades (Bernstein i Guth 1961). Hi ha discrepàncies sobre l'evolució temporal d'aquest fenomen. Després d'una compressió nerviosa, la poliinnervació arriba al màxim als 15 dies afectant un 45% de les fibres musculars, per reduir-se als dos mesos a un 8% (Letinsky et al 1976, Gorio et al 1983), mentre que després de la neurorràfia muscular directa un 22% de fibres musculars es troben 16 setmanes després de la lesió poliinnervades (Kuiken et al 1995, Ostberg et al 1986). La poliinnervació de les dianes glandulars i musculars afecta tots els grups experimentals, encara que de manera més intensa els de lesions de resecció (8-34%) que els compressió o secció (4-19%), de manera que es manté com a mínim als tres mesos de l'operació. Tots els procediments que determinen una reinnervació lenta i una col·lateralització extensa afavoreixen la hiperinnervació i la poliinnervació muscular després de lesions. L'efecte apromotor de l'adhesió i la proliferació de determinats factors tròfics alliberats per cèl·lules musculars durant la denervació determinen el seu grau d'hiperinnervació i poliinnervació (Politis et al 1982). Tant l'acumulació de molècules d'adhesió N-CAMs (Covault i Sanes 1985) com l'increment en l'expressió de GDNF en fibres musculars (Nguyen et al 1998), augmenten la hiperinnervació i la poliinnervació musculars després de lesions.

### *3.6.8. Fenòmens d'efapsi en axons regeneratius*

Partint de la base que diferents estudis han demostrat fenòmens d'excitació creuada entre fibres nervioses sensorials i motores, especialment quan aquestes són immadures i estan parcialment desmielinitzades (Amir i Devor 1992, Devor 1994, Liu et al 1999), diversos autors han relacionat les sincinèsies, moviments associats i contractures de la musculatura facial després de lesions amb l'excitabilitat per contacte entre axons a nivell del punt de lesió (Sadjadpour 1975, Montserrat i Benito 1988). Altres treballs l'han considerat com una possible explicació a respostes motores produïdes per estimulació cutània després de seccions i reparacions dels nervis mitjà i cubital en humans (Montserrat i Benito 1990). L'excitació creuada entre axons motors, sensorials i autonòmics produiria l'associació de contraccions musculars, percepció sensorial o secreció glandular que habitualment es produeixen independentment. Diverses síndromes derivades de lesions nervioses com la secreció llagrimal associada a la percepció gustativa (síndrome de les llàgrimes de cocodril) o la vasodilatació i sudoració en la regió temporal durant la ingesta (síndrome auriculotemporal) que s'explicaven en base a la reinnervació aberrant del nervi corda del timpà i auriculotemporal respectivament, podrien produir-se també per efapsis (Montserrat i Benito 1988). No estan clars els mecanismes pels quals es formen aquestes falses sinapsis (efapsis axo-axòniques), ni les raons que expliquen l'excitabilitat creuada. En models de lesions sensorials i formació de neuromes s'ha trobat que els canvis en l'expressió de canals iònics de la membrana axonal (Devor et al 1992, Matzner i Devor 1994) generen en l'axó un estat d'hiperexcitabilitat que afavoreix l'activació creuada i també que l'alliberament de neurotransmissors podria estimular directament fibres mielíniques A $\beta$ -A $\delta$  i amielíniques tipus C (Amir i Devor 1992). Les nostres dades no descarten que mecanismes d'efapsi a nivell del punt de lesió entre axons que ja han reinnervat alguna diana pugui explicar una part de l'activitat aberrant detectada, especialment en els grups de resecció que als 90 dpo mantenen axons més immadurs a nivell intratubular. A més, l'elevat grau de suposada "poliinnervació" muscular i

autonòmica podria correspondre a que quan s'estimula en grups experimentals els axons d'un fascicle a nivell proximal de la lesió, l'activitat es transmet a axons d'altres fascicles que aberrantment innerven la mateixa diana. Dues informacions addicionals ajuden a confirmar aquesta hipòtesi: en primer lloc que el grup de tubulització doble en el qual els fascicles tibial i peroneal queden totalment aïllats la poliinnervació muscular, sensorial i sudomotora és molt reduïda. En segon lloc, que els increments de les amplituds totals dels PANCs (nervis digitals i nervi tibial) obtinguts per estimulació fascicular no es poden explicar per fenòmens de poliinnervació de la mateixa cèl·lula diana, donat que en aquest cas no es detecta l'activitat de despolarització del receptor cutani sinó del propi nervi. Així, aquests increments de l'amplitud global que oscil·len entre un 6-46% de l'amplitud total i són més elevats en els grups de resecció, poden explicar-se en part per excitabilitat creuada entre axons.

### *3.6.9. Aspectes moleculars de l'especificitat de regeneració i reinnervació*

Durant el desenvolupament del sistema nerviós, un complex programa de senyals moleculars vetlla per tal que cada neurona elongui el seu axó i es connecti amb una diana que li correspon en un individu adult (Aldskogius i Molander 1990). Cada neurita en creixement és guiada per una sèrie de senyals sincronitzades dependents del medi de creixement, el propi axó i el programa de desenvolupament de la seva diana. Després de lesions els axons regeneratius i els òrgans diana denervats recapitulen de manera parcial la seva pròpia ontogènia, fet que condueix en la majoria dels casos a patrons de reinnervació diferents als originals. L'especialització neuronal que comporta el desenvolupament fa desaparèixer una gran part dels mecanismes que guien els axons individualment als seus destins, generant alteracions com la reinnervació aberrant, la hiperinnervació (Angelov et al 1993) i la polinnervació persistent (Kuiken et al 1995). Diferents estudis han demostrat que la reinnervació després de lesions nervioses en rates neonatals és, malgrat la mort neuronal, encara altament específica i el patró resultant semblant a un animal control, mentre que a partir de les 3 setmanes la reinnervació perd aquesta especificitat i adopta els limitats nivells d'un adult (Aldskogius i Molander 1990, Laskowski i Sanes et al 1988, DeSantis et al 1992). En principi, la recuperació funcional correcta després de lesions es pot aconseguir per dos mecanismes: la reinnervació a l'atzar dels òrgans diana compensada secundàriament per un reajustament de la connectivitat sinàptica central i perifèrica, o per una reinnervació altament específica de les dianes distals (Aldskogius i Molander 1990).

Hi ha tres fonts fonamentals que produeixen molècules guia i expressen receptora per les mateixes durant la regeneració: l'axó, les cèl·lules de Schwann i les cèl·lules dels òrgans diana (Tessier-Lavigne 1996). Els axons no creixen en una trajectòria contínua, sinó que a través dels seus cons de creixement naveguen a petits passos, a mesura que es produeix el reconeixement de molècules específiques, alternant entre trajectes rectilinis i punts de "presa de decisió". S'han definit quatre forces de guiatge del con de creixement, dues d'elles actuen per contacte directe proteïna-receptor: l'atracció per contacte i la repulsió per contacte, i les dues restants a distància per factors difusibles: la quimioatracció i la quimiorepulsió (Tessier-Lavigne i Goodman 1996). Segons la posició de la font

productora tant les molècules repulsives com atractives poden empènyer (*push*), estirar (*pull*) o bé entre ambdues bloquejar (*hem*) l'axó, mentre que combinacions de molècules en diferents posicions poden dirigir canvis de trajectòria. Amb aquest repertori d'elements tenen lloc funcions de fasciculació (separació) i desfasciculació (unió), múltiple o selectiva d'axons, que permetin separar un o diversos axons del fascicle en qual viatge per tal que es dirigeixen a diferents branques d'un nervi o ajuntar diversos axons en una branca única per generar una via convergent (Tessier-Lavigne i Goodman 1996).

Durant el procés de regeneració postlesió perifèrica, es produeix un increment notable de l'expressió de molt diversos factors neurotròfics, principalment per part de les CS i altres cèl·lules no neuronals del nervi distal en degeneració, així com una acumulació en els òrgans diana (DiStefano et al 1992, Fu i Gordon 1997, Verdú i Navarro 1998). L'acció primària dels factors tròfics radica en afavorir la supervivència i el creixement dels axons lesionats, però, a més contribueixen a guiar els axons regeneratius i alguns regulen la reconexió sinàptica amb cèl·lules diana. Les molècules d'adhesió cel·lular (CAMs), que inclouen les superfamílies de les immunoglobulines (L1/Ng-CAM, NILE, N-CAM) i les caderines (N-caderina), poden actuar com a lligand i receptor a la vegada i generen activitats d'atracció per contacte del con de creixement. La seva expressió s'incrementa després de lesions nervioses i estan involucrades en activitats d'adhesió entre axó-axó o axó-membrana basal (integrines-molècules de la matriu extracel·lular). Les molècules de la matriu extracel·lular i la làmina basal inclouen entre altres proteïnes: laminina, col·lagen, tenascina, fibronectina i una gran varietat de proteoglicans. La majoria dels seus components estan produïts per les CS i requereixen preferentment del contacte dels axons regeneratius per a la seva síntesi. Poden generar atracció per contacte (laminina, col·lagen, tenascina C) o repulsió per contacte (tenascina) i els seus receptors principals als axons són les integrines i secundàriament les Ig-CAMs i els proteoglicans (Fu i Gordon 1997).

Entre les molècules que actuen de guia durant el desenvolupament es coneixen diverses famílies, de les quals les principals són netrines, semaforines i neuropilines. Les netrines constitueixen una família de lligands i receptors amb activitat de guia bifuncional ja que poden tenir efectes quimioattractants sobre alguns axons i quimiorepellers sobre altres (Tessier-Lavigne i Goodman 1996) durant el desenvolupament. Les semaforines es divideixen en sis classes (I-VI) i actuen sobre un receptor propi conegut com a neuropilina-1 (NP-1). Són proteïnes que poden ser alliberades per secreció, forma sota la qual actuen com a quimiorepellers (II, III, IV), o bé estar integrades en la membrana cel·lular (classes I, IV, VI) mitjançant funcions de repulsió per contacte (Chen et al 1998). S'ha demostrat l'expressió de semaforina III/collapsina-1 i del receptor neuropilina-1 en motoneurons de mamífers adults on té efectes quimiorepulsius i indueix el col·lapse dels cons de creixement, definint el patró de projeccions dels axons sensorials de la medulla espinal (Pasterkamp et al 1998, Tessier-Lavigne i Goodman 1996). Després de lesions permanents del nervi ciàtic s'ha observat als 7 dies una disminució mantinguda de l'expressió del gen de lligand i receptor en motoneurons que concorda amb un increment de l'expressió de GAP-43, marcadora d'activitat de creixement neurític. Després

de lesions de compressió, s'observa un decreixement de la mateixa expressió que retorna cap als nivells normals a mesura que té lloc la reinnervació perifèrica i que oferiria permissivitat a la ramificació de projeccions sensorials  $A\alpha$ ,  $A\beta$ ,  $A\delta$  i C sobre les làmines I-V després de lesions perifèriques (Pasterkamp et al 1998), així com als teixits perifèrics denervats (Tanelian et al 1997).

En els cons de creixement, a mesura que es desplacen s'han detectat increments cíclics de la concentració intracel·lular de  $Ca^{2+}$  responenent a les interaccions amb molècules de l'entorn. L'augment intracel·lular de  $Ca^{2+}$  coincideix amb aturades del creixement axonal, mentre que la supressió de l'alliberament intracel·lular d'aquest ió per mitjà d'un quelant incrementa la motilitat del con (Gómez i Spitzer 1999). Els efectes atraients o repelents de diferents factors tròfics i neurotròfics que actuen com a guies dels cons de creixement estan mediat per modificacions dels nivells de nucleòtids cíclics (AMPc) induïts per modificacions en la concentració intracel·lular de  $Ca^{2+}$ . La disminució dels nivells d'AMPc intracel·lulars o el bloqueig de la proteïna dependent de nucleòtids cíclics proteïnaquinasa A, fa que factors quimioatraients (BDNF, Acetilcolina, netrina-1) tinguin efectes repel·lents (Caroni 1998). És molt probable que modificacions dels nivells de nucleòtids cíclics del con de creixement en funció de l'entorn expliquin el comportament dual quimioatractiu i quimorepelenent d'alguns factors tròfics com la netrina-1. Ara bé, no tots els factors actuen de la mateixa manera. D'una banda no es coneix el mecanisme pel qual la MAG té efectes repel·lents que la converteixen en un dels principals inhibidors de la regeneració al sistema nerviós central, l'activitat atractiva o repelenent d'altres factors com l'NT-3 o la semaforina III/D no responen a canvis dels nivells de  $Ca^{2+}$  o AMPc sinó als de GMPc (Caroni et al 1998).

En conseqüència, una constel·lació de molècules i receptors regulen durant el desenvolupament del sistema nerviós la connectivitat de les neurones entre elles i amb els seus respectius òrgans diana. En individus postnats i adults, una gran part d'aquests mecanismes es perden, dificultant després de lesions el restabliment de connexions compatibles amb el desenvolupament de la funció. De tots els factors-guia enunciats en aquesta discussió, semblen jugar un cert paper com a possibles reguladors de l'especificitat de la regeneració i la reinnervació després de lesions perifèriques o centrals en animals postnats i adults: els factors neurotròfics (neurotrofines i citoquines), les molècules d'adhesió cel·lular (CAMs), les proteïnes associades a la mielina (MAG), les proteïnes de la matriu extracel·lular i les semaforines. Si d'una banda l'estudi de les molècules i receptors amb activitat tròfica durant la regeneració nerviosa s'està estudiant *in vitro* i *in vivo* abastament, la recerca sobre factors de guiatge axonal en animals postnats i adults es troba encara en els seus inicis. Així, s'han desenvolupat alguns treballs *in vivo* que demostren els efectes favorables de matrius amb proteïnes de la matriu extracel·lular sobre la quantitat (Labrador et al 1998, Ceballos et al 1999), però no aborden el seu efecte sobre l'especificitat de la regeneració. En qualsevol cas, conèixer quins són els mecanismes moleculars que regulen la preferència fascicular dels axons, la regeneració motora i sensorial preferent, la fasciculació i defasciculació i l'eliminació selectiva de col·laterals és fonamental per poder establir noves teràpies, no exclusivament quirúrgiques, útils per a millorar aquest aspecte tan fonamental de la reinnervació després de lesions per a la recuperació de la funció global.

## 4. Recuperació de respostes reflexes espinals

Un dels elements importants per garantir que després d'una bona reinnervació muscular i sensorial perifèrica sigui possible aconseguir la recuperació de la funció global de locomoció és la restitució estructural i funcional del complex sistema de circuits reflexes espinals regulen l'activitat locomotora. Els circuits reflexes monosinàptics (reflex miotàtic), disinàptics (miotàtic invers) i polisinàptics (reflexos de retirada ipsilaterals flexors i creuats extensors i flexors) són fonamentals en el control i la coordinació entre extremitats i grups musculars flexors i extensors del to muscular en el moviment (Canedo 1998, Floeter 1998, Levin i Feldman 1994). Després de lesions perifèriques i de la desconexió dels òrgans diana es produeix a nivell central l'aïllament de la neurona que redueix el nombre de botons sinàptics que mantenia amb cèl·lules i projeccions veïnes (Sumner i Watson 1971, Havton i Kellerth 1990, Brännstrom et al 1992a, Pastor et al 1997), que es tendeix a recuperar amb la reinnervació perifèrica (Brännstrom et al 1992b). Hi ha una certa controvèrsia sobre l'element desencadenant d'aquest *stripping* sinàptic encara que una de les hipòtesis més acceptades és que cèl·lules d'astròglia i micròglia activades i en fase de proliferació s'interposen entre els elements presinàptics de les dendrites afectades, eliminant d'aquesta manera les seves terminals (Blinzinger i Kreutzberg 1986, Graeber i Kreutzberg 1988, Nieto-Sampedro 1996, Aldskogius i Kozlova 1998). Des del punt de vista electrofisiològic, l'isolament neuronal comporta una reducció de l'activitat sinàptica amb una reducció del nombre i l'amplitud dels potencials excitatoris postsinàptics (PEPS) i de la freqüència de descàrrega evocats per estimulació axonal (Kuno 1964, Kuno i Llinás 1970), que també es recuperen amb la reinnervació (Mendell i Scott 1975, Moreno-López et al 1997, De la Cruz et al 1993, 1996).

En aquest treball s'ha avaluat, en el model de lesió del ciàtic, el curs dels canvis en les respostes reflexes motores que ja han estat estudiades especialment en lesions dels parells cranials (de la Cruz 1993, Valls-Solé i Tolosa 1989, Valls-Solé et al 1992, Cossu et al 1999). Es vol analitzar, en primer lloc, la capacitat d'aconseguir, després de diferents tipus de lesions, no només la reinnervació perifèrica, sinó la reconexió espinal, per tal de mediar novament respostes reflexes que han quedat abolides per la lesió. A més, cal valorar les característiques electrofisiològiques d'aquestes respostes respecte del grau de reinnervació distal aconseguit per cada grup i en relació a la recuperació global locomotora.

### 4.1. Avaluació dels reflexos monosinàptics i polisinàptics

Donat que les respostes reflexes són evocades per circuits compostos per un òrgan receptor, una via nerviosa aferent, sinapsis i interneurons espinals segons cada modalitat, una via eferent i un òrgan efector (en aquest cas el múscul) la seva recuperació indica que el procés regeneratiu ha permès tancar l'arc reflex, restituint el funcionalisme del circuit i la seva resposta. Per contra, la no recuperació de la resposta no indica en quin o quins d'aquests elements s'ha produït l'alteració. Per poder comparar les diferències entre respostes reflexes recuperades entre grups de lesions i

reparacions, s'ha efectuat una tanda de normalitzacions respecte al grau de reinnervació de l'òrgan efector o de la via aferent. Així, com l'amplitud i el temps de latència de l'ona H homònima de cada múscul depenen del grau de reinnervació muscular absolut, s'ha calculat la relació d'amplitud de l'ona H màxima versus l'ona M màxima i la diferència de les respectives latències, que indica el trànsit de l'estímul com a estimació de la conducció espinal en un segment perifèric-espinal-perifèric, proximal a la lesió. En els reflexos polisínaptics ipsilaterals i creuats l'òrgan efector no està afectat per la lesió, però per contra, com que s'ha estimulat el nervi tibial per sota el punt d'afectació, el nombre i el grau de maduració dels axons regenerats condicionen la resposta reflexa. Per això, s'ha restat al temps de conducció de cada component reflex el temps de latència del PANC tibial del nervi regenerat i s'ha normalitzat l'amplitud de resposta per l'índex de recuperació (segons el percentatge del valor control) del PANC del nervi tibial. Per tal d'aconseguir resultats consistents i comparables i no dependents de la facilitat de reinnervar receptors perifèrics (Verdú i Navarro 1997), els reflexos no han estat evocats per estímuls fisiològics. El reflex miotàtic no s'ha obtingut per estirament del tendó muscular (Scott 1995, Scott i Panesar 1994) sinó per estimulació elèctrica directa de les aferents Ia a nivell de la fenedura ciàtica (Fisher 1992, Navarro et al 1996); igualment, el reflex de retirada no s'ha evocat per aplicació d'estímuls tàctils i nociceptius sobre la pell (Holmberg i Schuenborg 1996) sinó per estimulació elèctrica de les fibres sensorials A $\beta$ , A $\delta$  i C del nervi tibial (Meyerson et al 1995, Navarro et al 1999).

La complexitat de les respostes reflexes està en part basada en les característiques de les seves sinapsis, que actuen com a connexions dinàmiques, el funcionament de les quals es regula a mig i llarg termini per mecanismes de col·lateralització i selecció de col·laterals i a curt termini moment a moment per fenòmens de potenciació, facilitació i depressió sinàptica (Mendell et al 1984, Waxman 1999). La influència de circuits descendents i locals de control sobre l'eficàcia de la transmissió en interneurons de reflexos polisínaptics o les sinapsis entre fibres Ia i motoneurons és elevada (Canedo et al 1998, Floeter 1998), raó per la qual no és senzill aconseguir reproduir en cada animal condicions d'avaluació exactament similars. Així, els resultats obtinguts mostren nivells de dispersió superiors als mostrats en altres proves d'aquest treball, fet que en alguns casos, impedeix trobar diferències estadísticament significatives entre grups. Alguns models opten per l'espinalització com a procediment per reduir la variabilitat induïda per les vies descendents, generant de ben segur amb aquesta lesió nous canvis estructurals i funcionals. En el nostre treball s'ha optat per realitzar un seguiment en els mateixos subjectes de la recuperació de l'activitat reflexa al llarg de tres mesos de seguiment postlesió i, a més, fer-ho en les condicions més fisiològiques possibles per a l'animal. El grau d'anestèsia és un aspecte a tenir en compte, doncs pot afectar les respostes reflexes al modificar la desconexió funcional de nivells suprasedgmentaris. Així, com en d'altres treballs previs, s'ha avaluat els animals sota anestèsia amb pentobarbital utilitzant tècniques d'estimulació elèctrica transcutània i de registre amb agulles monopolars intramusculars (Navarro et al 1996, Lázaro et al 1999, Navarro et al 1999). Altres dades no indiquen diferències significatives en l'amplitud i latència de l'ona H utilitzant pentobarbital sòdic (70 mg/kg i.p.) o solució d'uretà-cloralosa (0,8 g/kg i.p.) (Meinck 1976), ni entre pentobarbital (40 mg/kg i.p.), hidrat de cloral (300 mg/kg i.p.) sol o amb

inducció prèvia amb èter, o Avertin (1,4 ml i.p. de 2 g tribrometanol, 1 ml 3-pentanol i 8 ml etanol absolut en 90 ml solució salina) (observacions personals; amplituds ona H del múscul plantar: pentobarbital  $1,4 \pm 0,2$  mV; Avertin  $1,1 \pm 0,2$  mV; hidrat de Cloral  $1,5 \pm 0,4$  mV).

Els resultats obtinguts mostren que, després de lesions de diversa consideració, en tots els animals que presenten reinnervació muscular es registra una gran recuperació de la resposta reflexa monosinàptica (ona H). La recuperació dels reflexos polisinàptics ipsilateral i creuats està dificultada en lesions de resecció amb reparacions poc efectives com és la tubulització amb guia de silicona. Els components mediat per fibres tipus C semblen especialment els més afectats. Tant el reflex monosinàptic com el polisinàptic mostren respostes d'amplitud relativa incrementada en les primeres fases de reinnervació muscular, on pocs axons donen lloc a descàrregues de llarga durada i elevada intensitat. Aquestes respostes exagerades es normalitzen a mesura que es completa una bona reinnervació distal en el reflex monosinàptic, mentre que es mantenen més sostingudes i mostrant una involució més lenta en els polisinàptics. L'estimació del temps de conducció central s'incrementa en ambdós tipus de reflexos amb la lesió però es normalitza ràpidament en les primeres fases de reinnervació. La seva dinàmica de recuperació és clarament més ràpida que la de l'amplitud màxima mesurada.

## 4.2. Reflex espinal monosinàptic

Descrit pel fisiòleg alemany Paul Hoffman (Hoffman 1918), el reflex de Hoffman o ona H és una resposta motora tardana, deguda a impulsos transmesos a través de l'arc reflex miotàtic, que inclou fibres mielíniques gruixudes (Ia), aferents que estableixen sinapsis amb motoneurons espinals amb capacitat per activar una població de fibres motores eferents, les quals es projecten sobre el múscul.

### 4.2.1. L'ona H en animals control

Aquest reflex monosinàptic es manifesta en un registre electromiogràfic com una ona d'aparició posterior a l'ona M. Els nostres resultats en rates control, obtinguts amb els valors preoperatoris de 184 animals, indiquen que l'ona H té una latència entre 6 i 7 ms segons el múscul i una amplitud que oscil·la entre 8-10% respecte de l'ona M màxima dels diferents músculs, dins dels rangs definits per altres autors en models semblants en rates (Meinck 1976, Thomson et al 1992, Navarro et al 1999). L'ona H del múscul plantar mostra una latència més llarga justificable pel major trajecte a recórrer fins al múscul efector respecte dels músculs gastrocnemi i tibial anterior. Al llarg dels 90 dies de seguiment del grup control s'ha observat un increment de l'amplitud de l'ona H, atribuïble al creixement i que concorda amb un augment proporcionalment menor de l'ona M, raó per la qual la relació d'amplitud H/M presenta una tendència a l'estabilitat o a l'increment.

D'acord amb d'altres treballs previs, l'ona H s'aboleix mitjançant la secció selectiva de les arrels dorsals (Stanley 1981, Navarro et al 1999) o amb l'administració epidural d'anestèsics locals que

aturin la conducció aferent (Navarro et al 1996, Lázaro et al 1999). Els treballs realitzats amb una sèrie de 34 controls demostren que el llindar d'evocació de la mínima resposta és bastant similar per les ones H i M en tots tres músculs, sense diferències significatives. La intensitat llindar per evocar activitat motora directa (M) i reflexa (H) en el múscul plantar és sempre superior a la necessària pels músculs gastrocnemi i tibial anterior. La raó més probable rau en què la disposició fascicular dins del tronc del nervi ciàtic s'organitza de manera que les fibres motores i sensorials que es projecten sobre musculatura proximal ocupen posicions més superficials que les que ho fan sobre músculs distals. Així, la impedància de la massa de teixit que s'interposa és superior pels axons més profunds i per tant, es necessita més càrrega per a estimular-los (Sunderland 1991). Malgrat que en la majoria de subjectes l'ona H té un llindar molt semblant a la M, la seva amplitud creix més ràpidament en un rang d'intensitat d'estimulació baix fins arribar a la màxima amplitud abans, mentre que l'ona M es recruta més lentament i mostra el seu llindar màxim per damunt del de l'ona H (Meinck 1976). Si es continua estimulant per damunt del llindar màxim, s'observa un manteniment de l'amplitud de l'ona M, però una clara tendència a la pèrdua d'amplitud (20-60%) de l'ona H. Així, també en acord amb les observacions de Meinck (1976), la relació d'amplituds H/M al llarg d'una sèrie d'estímuls a intensitats creixents s'incrementa fins a un màxim que es correspon amb el llindar màxim de la H, per baixar a continuació cap a valors propers als originals. A intensitats supral·lindars per a la M es pot observar en animals l'aparició d'una ona tardana de latència més curta (a l'inrevés que en humans) que la H, de morfologia semblant però més variable, que no té lloc amb estímuls de baixa intensitat i que s'ha identificat com l'ona F (Lloyd 1943, Fisher 1992, Hultborn i Nielsen 1995). Les nostres observacions indiquen que té un llindar molt superior a la H, que es molt variable en amplitud i que inversament a la H mostra tendència a incrementar la seva amplitud a elevades intensitats i a més a més és resistent a la rizotomia dorsal. A diferència dels humans, en rates hi ha determinats rangs d'intensitat que evoquen simultàniament les ones H i F en un mateix registre, fet que obliga a diferenciar-les per la seva dinàmica.

Mitjançant l'estimulació del nervi tibial i el registre bioelèctric a nivell de les arrels dorsal i ventral medul·lars s'ha calculat una latència central d'entre 1,5 i 2,7 ms, amb una velocitat de conducció semblant entre el segment aferent i el segment eferent (Meinck 1976). La nostra estimació del temps de conducció espinal és més elevat (4-5 ms) perquè, en restar les latències de l'ona H i la M, s'està considerant a més del temps de trànsit espinal, el temps de conducció de l'estímul per aferents sensorials des de la fenedura ciàtica fins a la medul·la espinal (segments L4-L6) i posteriorment un trajecte equivalent en la via motora. Tot i que comprèn un cert recorregut perifèric, permet calcular en grups experimentals canvis del temps de sinapsis espinals, assumint que la conducció a través dels segments sensorial i motor perifèric té lloc en tots els animals de la mateixa manera. Al llarg dels 3 mesos de seguiment, l'estimació de la conducció espinal es manté més estable que la latència aïllada en el grup de rates control. Aquest fet reflexa que la reducció del temps de latència de l'ona H està més condicionada per la mielinització i la maduració neural distal que per canvis proximals o del temps sinàptic en aquest rang d'edat (Sato et al 1985, Fraher et al 1990, Verdú et al 1996).

L'ona H resulta de l'activació d'unitats motores de tamany petit i recrutament ràpid i que la seva resposta màxima activa una població del 30-40% de les unitats motores totals (Meinck 1976, Fisher 1992, Hultborn i Nielsen 1995). El fet que l'amplitud màxima de l'ona H respecte de la M és del 8-10%, resulta consistent amb que una gran part de les unitats motores que generen la resposta reflexa són petites. L'eficàcia del circuit que genera l'ona H depèn de l'excitabilitat motoneuronal i també de circuits inhibidors que actuen sobre les sinapsis de les fibres aferents Ia. Aquestes influències determinen diferències en la distribució i la facilitat d'obtenció dels reflexos entre diferents espècies i amb l'edat postnatal, en funció de la maduració del sistema nerviós. En humans s'ha demostrat que degut a l'elevada durada del potencial excitatori postsinàptic de les motoneurons, la via monosinàptica està mediatitzada per vies polisinàptiques via interneurons inhibidores activables per aferències Ib i els circuits inhibitoris de Renshaw (Fisher 1992, Floeter 1998). Canvis en l'excitabilitat de les interneurons poden determinar així l'amplitud observada en l'ona H. Aquesta modulació fa que en humans adults, el reflex de Hoffmann només sigui detectable clarament en alguns músculs de la cama i de l'avantbraç. Es postula que l'existència de circuits inhibitoris locals i segmentaris de les sinapsis entre fibres aferents Ia i motoneurons espinals desencadena una resposta controlada del circuit miotàtic mitjançada per unitats motores petites de recrutament ràpid (Fisher 1992, Hultborn i Nielsen 1995).

#### *4.2.2. Recuperació del circuit reflex miotàtic després de lesions*

La primera observació que cal extraure dels nostres experiments, és que la recuperació de la resposta reflexa H homònima està estretament lligada a la reinnervació del seu òrgan efector. Els grups de compressió i de secció mostren l'aparició concomitant de les ones M i H. Per contra, alguns animals dels grups de resecció, mostren en molts casos als 30 i/o 60 dpo reinnervació muscular sense que es detecti la resposta reflexa. Al final del seguiment la gran majoria dels animals amb reinnervació muscular, independentment del tipus de lesió, mostren una recuperació funcional efectiva del reflex miotàtic, fet que indica que a més d'una bona reinnervació perifèrica del múscul per part d'axons motors i el manteniment d'una població activa de fibres Ia a nivell del nervi ciàtic, s'ha produït el restabliment d'un patró de connexions espinals entre neurones sensorials i motores com a mínim compatible amb l'evocació d'aquesta resposta reflexa (Scott 1985, Scott et al 1988). El retard de temps postlesió amb què en alguns casos es detecta la resposta reflexa monosinàptica respecte de la directa pot atribuir-se a la dificultat per a detectar-la en fases inicials, perquè les variacions en el grau de mielinització de les fibres motores genera PAMC polifàsics de baixa amplitud, o bé al fet descrit en la literatura que la reextensió de dendrites motoneuronals i axons de neurones sensorials i el reestabliment de connexions té lloc només una vegada s'ha assolit la reinnervació d'òrgans distals (Sumner i Watson 1971, Sumner 1977, Brännstrom et al 1992b). S'ha descrit que la reinnervació de les fibres musculars intrafusals té lloc més tard que la de les extrafusals i, a més, les terminacions anuloespirals sensorials equatorials del fus reapareixen més tard que les terminacions fusimotors en la regió polar (Boyd i Smith 1984, Verdú i Navarro 1997). És probable que, fins i tot en els grups de reinnervació més ràpida i eficient, l'assoliment d'un cert grau de reinnervació perifèrica motora i

sensorial sigui una condició necessària per que es produeixi la reconnexió central dels circuits reflexos espinals.

Considerant el funcionament complet del reflex miotàtic, les possibilitats de recuperació poden ser pitjors que les demostrades per la resposta H, si el receptor sensorial no és reinnervat correctament. Després de lesions nervioses compressives s'ha descrit una gran especificitat de territoris de projecció dins del fus muscular per part de motoneurons que reinnerven les zones apicals de les fibres intrafusals i de fibres Ia que es disposen en espiral a l'entorn de la regió equatorial (De Santis i Norman 1993, Proske 1997). Molts fusos musculars reinnervats mostren una distribució de perfils de menor densitat i pitjor organitzats que en els controls, i també es detecten fusos amb regions denervades i d'altres sense innervació (Verdú i Navarro 1997). De fet, el nombre de fusos innervats i el nombre i diàmetre de les fibres motores i sensorials és clarament inferior als valors controls (De Santis i Norman 1993, Verdú i Navarro 1997). La qualitat i la quantitat de la reinnervació fusar sembla dependre de la gravetat de la lesió. Així, després de 2 setmanes de denervació per compressió, les g-motoneurons i les fibres Ia reinnerven els fusos musculars i tenen capacitat per evocar una activitat reflexa normal (Scott 1985), mostrant una gran capacitat de recuperació que és coincident amb els nostres resultats. Estudis d'activitat fusar realitzats amb períodes de denervació superiors als 4 mesos per compressions repetides, demostren que, malgrat la seva alterada estructura, els fusos tenen una sensibilitat de resposta a petits estiraments i una freqüència de descàrrega equivalent als controls (Scott i Panesar 1995). En els escassos estudis que han estudiat la recuperació de reflexos miotàtics després de lesions de secció nerviosa s'ha trobat, al cap de tres anys de seguiment en gats i malgrat la bona reinnervació muscular del solí, una manca de respostes reflexes homònimes i heterònimes per estirament tendinós del múscul reinnervat. S'ha pogut veure que l'estirament del múscul o l'estimulació elèctrica són capaços d'evocar activitat de descàrrega a les aferents Ia, fet que demostra que l'alteració és deguda o bé a una reinnervació ineficient dels fusos musculars o bé a alteracions de la integració central (Cope i Clarck 1993, Cope et al 1994). Encara que les nostres dades mostren una gran capacitat de recuperació després de tota mena de lesions del circuit de l'ona H, això no garantitza la recuperació i el funcionament del reflex miotàtic homònim que ha de ser evocat per estirament i activació dels fusos musculars. En tot cas, es requereix de la reinnervació per un nombre crític d'aferents fusals per poder estimular un nombre suficient de motoneurons espinals. Les dades obtingudes després d'una sutura creuada demostren que les aferents sensorials i eferents musculars que participen del reflex miotàtic de músculs extensors i flexors mostren una capacitat de reinervació de dianes que no depèn de l'especificitat i que és equivalent a la d'una sutura correcta. El fet que tant el nervi tibial com el peroneal siguin nervis mixtes amb fibres motores i sensorials de totes les modalitats, permet que cadascuna trobi en el seu nou fascicle dianes adequades. Per contra, altres autors han descrit en reinnervacions creuades sural-tibial una disminució del nombre d'aferents sensibles a l'estirament muscular (Lewin i McMahon 1991a) que reflecteix una baixa taxa de reinnervació o la incapacitat de la majoria d'aferents sensorials del sural (de les quals una escassa proporció són tipus Ia i Ib donat que innerva un petit territori muscular) d'establir connexions que puguin ser funcionals.

#### 4.2.3. Alteracions del temps de conducció espinal

Quan es comença a recuperar la resposta H després de la denervació, s'observa un allargament del temps perifèric-espinal estimat i un increment de la proporció d'amplituds H/M. Ambdós valors es mostren dependents de la reinnervació perifèrica, de manera que tendeixen a normalitzar-se cap a nivells equivalents als preoperatoris. Els valors finals de la conducció espinal aconsegueixen situar-se més propers als preoperatoris que els de la relació d'amplituds, els quals en grups de resecció es mantenen anormalment elevats als 90 dpo.

L'allargament del temps de trànsit espinal és atribuïble segons diversos treballs a l'existència de PEPS en la motoneurona de menor amplitud i major duració que els controls i a un enlentiment de la conducció del segment intraespinal de l'axó sensorial (Eccles et al 1958, Mendell i Scott 1975, Mendell et al 1975, Mendell 1984). Després d'axotomia perifèrica, l'estimulació de la branca axonal espinal aferent comporta una disminució de fibres que evocuen PEPS al soma i en tot cas una disminució de l'amplitud i la latència d'aquelles que encara tenen capacitat per evocar-la (Horch i Lisney 1981). A nivell del segment perifèric, diversos estudis demostren que l'axotomia produeix una disminució de la velocitat de conducció del segment proximal de neurones motores (Mendell et al 1975) i sensorials mielíniques i amielíniques (Horch i Lisney 1981, Gallego i Adrover 1990, Lewin i McMahon 1991a, 1991b). Donat que la nostra estimació del temps de conducció espinal inclou un segment de conducció perifèrica a nivell plexular de les aferències sensorials i les eferències motores, l'enlentiment no és exclusivament sinàptic sinó que respon també a l'alteració perifèrica proximal a la lesió. La degeneració retrògrada té lloc des del punt de lesió fins als primers nodes de Ranvier en direcció proximal (Ramon y Cajal 1928, Fu i Gordon 1997) i no afecta segments més proximals de l'axó. Altres autors han descrit en conills adults una disminució significativa de la velocitat de conducció i del diàmetre axonal del segment proximal, que retornen a valors normals en poc temps si hi ha reconexió distal i que en tot cas afecta un segment retrògrad d'entre 7 i 10 mm (Cragg i Thomas 1961, Gallego i Adrover 1990). La distància que separa el punt de lesió del punt d'estimulació a nivell de la fenedura ciàtic en el nostre cas és superior als 20-25 mm en la rata, raó per la qual és poc probable que la lesió afecti la velocitat de conducció de les fibres sensorials i motores per alteracions de la mielina de manera significativa, i es pot assumir que el retard de latència observat té una component majoritària sinàptica. Diversos treballs que han descrit un allargament del temps d'increment de PEPS en sinapsis Ia després de lesions de l'arrel anterior, l'ha atribuït a l'eliminació selectiva per *stripping* glial de les sinapsis que les fibres sensorials estableixen sobre el soma o les dendrites motoneuronals, i el manteniment o eliminació posterior de les connexions més distals que serien les que condicionarien l'allargament de la latència (Rall 1967, Kuno i Llinás 1969, Sumner 1979). En d'altres estudis s'ha trobat un increment de la resistència d'entrada en motoneurons que indica un increment del volum cel·lular i per tant de la constant de temps en la propagació del potencial d'acció (Kuno et al 1974, Gustafsson 1979), corroborat histològicament poques setmanes després d'una compressió perifèrica, per un increment del diàmetre somàtic de les motoneurons i una reducció del diàmetre dendrític amb tendència a la normalització parcial amb la

reinnervació (Swett et al 1991, Brännstrom et al 1992a, 1992b). Pel que fa a les neurones sensorials, només lesions de secció i resecció provoquen una mortalitat progressiva que afecta preferentment les cèl·lules de diàmetre petit (cèl·lules B i C) i que per tant no sembla que pugui alterar el nombre de fibres Ia que són les que intervenen en el reflex monosinàptic. Les neurones sobrevivents mostren una reducció del diàmetre somàtic d'un 30% que es manté si s'impedeix la regeneració (Vestergaard et al 1997) de manera que no sembla que es pugui produir un increment de la constant de temps de la transmissió del PEPS en la via aferent del reflex. Per contra, després de lesions de compressió la mort neuronal al gangli de l'arrel dorsal és gairebé nul·la i s'observa una certa tendència a l'increment del volum cel·lular menor que l'observada en motoneurons (Swett et al 1991, 1995). A més d'aquests factors, no es pot descartar l'existència d'alteracions de la sensibilitat o del nombre de receptors postsinàptics que redueixin l'eficàcia i la velocitat de les respostes reflexes. D'acord amb aquestes dades, només el grup X sotmès a compressió recupera un temps de conducció espinal dels tres músculs estudiats equivalent als valors preoperatoris. La resta de grups i especialment els de resecció, amb menors nivells de reinnervació, tenen valors més elevats que indiquen que la connectivitat espinal no ha retornat estructuralment ni funcionalment als nivells originals (Mendell et al 1984). Les nostres dades indiquen que els valors absoluts pel grup de sutura correcta i el de sutura creuada són equivalents i que, per tant, la velocitat de propagació perifèrica-central no sembla dependent de l'especificitat de la reinnervació. Diversos autors han establert una pitjor recuperació de la velocitat de conducció i la latència dels PEPS després de lesions en aferents sensorials Ia que reinnerven inespecíficament regions cutànies (Koerber et al 1995), mentre que d'altres proven l'adaptació de terminals sensorials cutànies a les velocitats de conducció de fibres tipus I en reinnervar fusos musculars (Lewin i McMahon 1991a). Si la maduració i mielinització de l'axó i l'eficàcia sinàptica depenen de la reinnervació perifèrica i de l'aportació de factors tròfics, en dirigir els axons del tibial al peroneal i a l'inrevés, en ambdós casos troben òrgans diana apropiats, fibres musculars esquelètiques i fusos musculars, i en qualsevol cas una font equivalent de factors tròfics que reguli el manteniment de les sinapsis centrals.

#### *4.2.4. Alteracions de l'excitabilitat del reflex monosinàptic*

Donada la dependència de l'amplitud de la resposta H homònima del grau de reinnervació del múscul efector, la relació percentual d'amplituds H/M ha estat utilitzada per determinar el volum de motoneurons respecte del total dedicades al control d'aquest reflex i l'excitabilitat del circuit (Fisher 1992, Thomson et al 1992, Shindo et al 1994). Així, maniobres com la contracció i la tetanització o trastorns que anul·lin el control descendent de les sinapsis espinals i incrementin l'excitabilitat permeten evocar més fàcilment reflexos monosinàptics en músculs on se solen observar amb dificultat (Levin i Feldman 1994). En acord amb les indicacions d'altres autors (Hultborn i Nielsen 1995), els nostres resultats demostren que l'ona H presenta una variabilitat elevada de la seva amplitud, fet que dificulta el seu seguiment i sobretot una acurada comparació entre diferents grups experimentals, particularment en fases inicials de la regeneració. L'amplitud relativa de l'ona H respecte de la M està clarament augmentada respecte al normal en els primers estadis de reinnervació muscular. A mesura que s'incrementa la reinnervació muscular distal per un nombre

cada vegada més gran d'axons, la relació H/M va disminuint cap als valors originals. Així, els grups que presenten una reinnervació ràpida tenen al final del seguiment valors no significativament diferents als preoperatoris, mentre que les lesions més greus o reparades per procediments terapèutics menys eficaços mostren al final del seguiment valors sostingudament elevats. L'increment de la relació d'amplituds H/M respecte al valor control posa de manifest que un nombre més important d'unitats motores són reclutades espinalment per les aferents sensorials per a desencadenar el reflex monosinàptic.

Tenint en compte que la reinnervació motora i sensorial dels fusos musculars no contribueix a l'evocació de l'ona H, donat que en aquest treball s'ha evocat el reflex per estimulació directa dels axons proximals a la lesió, hi ha dues hipòtesis que, sense excloure's l'una a l'altre, poden explicar les alteracions en la relació H/M: una explica els canvis de la proporció d'amplituds per canvis perifèrics de les característiques de les unitats motores reinnervants; l'altra contempla la possibilitat que siguin deguts a modificacions de l'eficàcia sinàptica entre les aferents Ia i les neurones motores.

#### *4.2.5 Plasticitat perifèrica*

La denervació indueix canvis en les propietats de les fibres musculars, de forma que el potencial de repòs transmembrana s'incrementa mentre que els receptors mostren una hipersensibilització a l'acetilcolina. Aquestes modificacions, que faciliten la despolarització de la cèl·lula muscular denervada i expliquen fenòmens com l'activitat espontània de fibril·lacions, es renormalitza a les poques setmanes d'iniciar-se la reinnervació retornant a les seves propietats habituals (Carmignoto et al 1981, Di Giamberardino et al 1981). Posteriorment es normalitza la freqüència de potencials de placa motora detectats en el múscul (Carmignoto et al 1981). És poc probable que la facilitat per a la despolarització muscular sigui responsable de la resposta augmentada que hem observat en l'activitat de l'ona H després de la reinnervació, ja que l'increment de la resposta es manté en la majoria de grups durant bastant de temps després de produïda l'arribada dels primers axons al múscul i que té tendència a disminuir lentament. A més, les dades sobre reflexos espinals polisínàptics demostren que processos semblants tenen lloc fins i tot quan el registre es fa sobre músculs que no han estat denervats.

Es podria especular que les motoneurones que condueixen la resposta reflexa corresponguin a un grup amb una capacitat superior de regeneració i reinnervació. Si bé és veritat que les motoneurones encarregades de desencadenar l'ona H corresponen a una població de motoneurones petites i de reclutament ràpid, no hi ha cap estudi que indiqui que tinguin una major taxa de regeneració. Donat que durant la reinnervació acostumen a col·lateralitzar extensament sobre un nombre de fibres motores superiors a l'original, es podria pensar que l'increment relatiu de l'ona H és degut a un augment de la mida de les unitats motores que hi participen. Tampoc hi ha evidències que la subpoblació de motoneurones del reflex H tingui una capacitat superior de col·lateralitzar i de generar unitats motores més grans que les motoneurones que no hi contribueixen. En tot cas, el fet que l'increment d'amplitud relativa de les respostes reflexes es mantingui fins i tot quan s'ha

acomplert la reinnervació màxima en alguns grups i de que es registri tant en reflexos polisinàptics com en respostes H heterònimes sobre músculs intactes no donen suport als mecanismes de plasticitat perifèrica (Lewin i McMahon 1991a, Seburn et al 1998, Mendell et al 1999).

#### *4.2.6. Plasticitat espinal*

Les vies descendents sobre les terminals presinàptiques de les aferents Ia i algunes interneurons de circuits locals inhibidors tenen capacitat per adaptar l'excitabilitat de la sinapsi del reflex d'estirament a les necessitats del moviment. Així, en la deambulació s'observa que durant la fase recolzament el reflex està facilitat i mostra una amplitud relativa a l'ona M superior, mentre que en la fase d'alçada el circuit està parcialment inhibït i la relació disminueix (Simonsen i Dyhre-Poulsen 1999). Després de lesions, és fonamental que la desconexió estructural i funcional que afecta la motoneurona axotomitzada involuioni i torni a restablir un patró sinàptic per tal que la reinnervació de dianes perifèriques pugui servir per l'execució de moviments complexos. Durant aquest procés, cadascun dels elements de l'arc reflex miotàtic sofreix canvis de les seves propietats físiques i elèctriques. Tant els canvis cel·lulars i sinàptics com l'activitat dels circuits locals i descendents moduladors poden explicar les modificacions observades en el reclutament de motoneurons per evocar la resposta H (King i Thomson 1995).

##### *4.2.6.1. Efectes de la lesió sobre les propietats cel·lulars i sinàptiques*

La motoneurona axotomitzada presenta una disminució del llindar d'excitació malgrat l'increment de la resistència d'entrada produïda per l'augment de volum (Eccles et al 1958, Mendell et al 1995, Mendell et al 1999). Clàssicament s'ha descrit que després de una lesió nerviosa no reparada, els PEPS evocats per estimulació d'aferents Ia intactes disminueixen progressivament en amplitud i incrementen la seva latència (Mendell et al 1975, Mendell et al 1995, Munson et al 1997); canvis que involuionen amb la reinnervació (Mendell i Scott 1975). Tot i així s'observen alteracions persistents del reclutament d'unitats motores i les propietats cel·lulars atribuïbles a la reinnervació de dianes no adequades per part d'alguns axons (Milner-Brown et al 1974). L'axotomia de fibres sensorials redueix la probabilitat d'evocar la despolarització de l'aferent primària i, cas d'aconseguir-ho, l'amplitud del PEPS és baixa. Amb la regeneració, el nombre de fibres que evoquen despolarització de l'aferent espinal torna a augmentar i es normalitza l'amplitud del PEPS (Horch i Lisney 1981). Els canvis que experimenten les neurones motores i sensorials de l'arc reflex tenen lloc durant el període de denervació, que en el nostre model correspon entre els 30 i 60 dpo segons el múscul i la lesió practicada. Com que la resposta H homònima s'ha registrat a partir de la reinnervació muscular, no hauria de reflectir aquests esdeveniments que paradoxalment són contraris als observats a partir del moment en què es recupera la innervació.

La lesió axonal perifèrica pot modificar l'excitabilitat de tota mena de neurones per mitjà de canvis en l'expressió de canals de  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$  i  $\text{Ca}^{2+}$  que són dependents de factors neurotròfics dels òrgans diana (McAllister 1999, Chew i Gallo 1999). La lesió per lligadura de fibres sensorials tipus C genera un decreixement del llindar d'excitabilitat i un increment de la durada del potencial d'acció de cèl·lules

sensorials petites del gangli de l'arrel dorsal, en relació amb un increment del nombre absolut de canals de  $\text{Na}^+$  (Zhang et al 1997, Dib-Hajj SD 1998). També s'ha descrit una reducció del corrent de sortida de potassi per una reducció en l'expressió somàtica de canals de  $\text{K}^+$  dependents de voltatge en neurones sensorials de totes les mides (Ishikawa et al 1999). Les modificacions de l'expressió de canals iònics és dependent de la gravetat de la lesió, donat que la disminució de canals de  $\text{Na}^+$  lents, l'increment de canals  $\text{Na}^+$  ràpids en el soma i l'axó i la disminució del llindar d'excitabilitat de neurones sensorials té lloc després de secció i lligadura però no de compressió nerviosa (Sakai et al 1998). Aquest fet posaria de manifest que la reorganització en l'expressió de canals iònics després de lesions nervioses perifèriques està condicionada per l'activitat de factors tròfics alliberats per l'organ diana i transportats fins al soma de la neurona (Chew i Gallo 1999, MacAllister et al 1999). Així, l'aplicació d'NGF en l'extrem tallat del nervi ciàtic incrementa l'expressió de canals de  $\text{Na}^+$  i aconsegueix revertir la reducció de l'expressió somàtica de canals de  $\text{Na}^+$  lents després de l'axotomia en neurones sensorials petites (Dib-Hajj et al 1998) i l'expressió de canals de  $\text{K}^+$  dependents de voltatge (MacAllister et al 1999). Hi ha també efectes selectius sobre determinats tipus de canals per part de neurotrofines específiques. Així el BDNF augmenta selectivament l'expressió de canals de  $\text{Na}^+$  i determinades famílies de canals de  $\text{K}^+$  dependents de voltatge, mentre que NT-3 mostra efectes reductors de l'excitabilitat cel·lular en neurones sensorials mitjançant l'increment de l'expressió de canals de  $\text{K}^+$  (MacAlister et al 1999). El canal de  $\text{Ca}^{2+}$  juga un paper fonamental en la regulació de l'excitabilitat de membrana, l'alliberament de neurotransmissor així com en l'expressió gènica i la plasticitat de fenòmens que determinen la capacitat de supervivència de les cèl·lules neurals. L'NGF produeix un increment en l'expressió de canals de  $\text{Ca}^{2+}$  tipus L, regulant l'entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  en neurones adultes, mentre que el bFGF és capaç d'actuar específicament sobre corrents de  $\text{Ca}^{2+}$  tipus L induint la seva expressió (Chew i Gallo 1999).

#### 4.2.6.2. La teoria neurotròfica: dependència d'òrgan diana

Els canvis funcionals de les sinapsis Ia-motoneurons havien estat estudiades en la majoria dels casos després d'axotomia crònica. Aquest estudis mostraven l'esmentat decreixement de l'amplitud dels PEPS (Mendell et al 1975, Mendell 1984), que no és immediat i ve precedit d'un increment després de lesions de les aferències Ia (Seburn i Cope 1998). En rates, 3 dies després de la secció nerviosa reparada de les aferents sensorials dels músculs gastrocnemi lateral i solí hi ha un increment dels PEPS de les motoneurons intactes del gastrocnemi medial per damunt dels valors controls abans de la lesió, produït per un augment de la probabilitat d'alliberament de neurotransmissors en la sinapsi Ia (Seburn i Cope 1998). En acord amb els nostres resultats, altres autors, han descrit a les 6 i 12 setmanes d'una rizotomia reparada de les arrels L6-S1, no només la recuperació sinó un increment respecte dels valors controls de l'amplitud dels PEPS registrats a les motoneurons i de la resposta reflexa muscular (Hellgren i Kellerth 1989). L'axotomia d'aferents sensorials produeix una reducció de l'activitat aferent cap a la població de motoneurons. De manera compensatòria i tal com demostren alguns treballs que han simulat una reducció de l'activitat Ia per mitjà de l'aplicació de tetrodotoxina sobre la via aferent (Gallego et al 1979), la inactivitat incrementa l'eficàcia de les sinapsis o la sensibilitat de les aferents que aconsegueixen reinnervar el fus muscular i podria

explicar no només el manteniment sinó l'augment de l'amplitud de la majoria de PEPS detectats en motoneurons (Gallego et al 1979, Seburn i Cope 1998). Al mateix temps la lesió atura el transport de neurotrofines com BDNF, NT-3 i NT-4 des del múscul cap a la medulla espinal on es pensa que col·laboren al control de l'eficàcia sinàptica (Distefano et al 1992, Munson et al 1997, Mendell et al 1999, McAllister et al 1999). L'aplicació d'NT-3 sobre fibres aferents axotomitzades és capaç no només de compensar la caiguda de l'amplitud dels PEPS de motoneurons intactes sinó d'evocar potencials d'amplitud significativament superiors; mentre que NT4/5 no modifiquen l'amplitud del PEPS però limiten la caiguda de la velocitat de conducció. Al mateix temps, la retirada del tractament amb qualsevol d'aquests factors neurotròfics sí que desencadena el decreixement esperat de l'amplitud del PEPS i una baixada de la velocitat de conducció de les aferents fins a valors habituals postaxotomia no reparada. Cap de les neurotrofines (NT-3, 4/5) aplicades modifica les característiques d'excitabilitat ni del PEPS evocat per aferents intactes sobre motoneurons axotomitzades (Mendel et al 1999). La privació espinal de determinats factors neurotròfics o combinacions, de factors podrien constituir el senyal per a l'increment de la probabilitat d'alliberament de neurotransmissor detectat després d'axotomia (Seburn i Cope 1998) que indueix la facilitació de la sinapsi estudiada. Les nostres dades obtingudes mitjançant l'anàlisi de l'ona H són consistents amb aquest model on les neurotrofines determinarien les propietats d'excitabilitat de les neurones sensorial i motores implicades, i al mateix temps l'eficàcia de la seva sinapsi. La sinapsi del reflex miotàtic té una capacitat modulable que s'incrementa després de lesions perifèriques acompanyades de la reinnervació de les seves dianes (Seburn i Cope 1998, Mendell et al 1999). La desconexió produeix un descens de l'eficàcia sinàptica que les nostres dades no reflecteixen perquè durant aquest període sense reinnervació no es pot evocar el reflex monosinàptic homònim. Una vegada comença la reinnervació es reestableix la connexió i el transport axonal i es modifica el tipus de senyals neurotròfics, de manera que l'hiperexcitabilitat que demostren les motoneurons a l'entrada de senyals aferents es demostra amb un increment de l'amplitud relativa de l'ona H. Un nombre més important de motoneurons amb una reobase disminuïda són despolaritzables a partir d'unes sinapsis Ia que manifesten una probabilitat incrementada d'alliberament de neurotransmissor. A mesura que té lloc la reinnervació perifèrica, el transport de neurotrofines cap als somes neuronals s'incrementa, l'excitabilitat cel·lular disminueix, l'eficàcia sinàptica es redueix i la quantitat de motoneurons reclutades per les aferents Ia per a desencadenar el reflex torna als valors habituals. Les nostres dades mostren que els grups sotmesos a lesions resectives amb baixos nivells de reinnervació mantenen l'excitabilitat fet que pot reflectir que el procés regeneratiu encara està en curs i pot evolucionar, o bé que la majoria de neurones no arriben a reinnervar la seva diana i per tant les poques restants mantenen la hiperexcitabilitat reflexa compensatòria. Una gran quantitat de treballs han començat d'aquesta manera a relacionar diferents neurotrofines i receptors amb la modulació del reflex monosinàptic espinal. Així mentre NT-3 s'ha associat sobretot amb l'acció promotora de la supervivència sobre neurones sensorials de les aferents Ia i Ib, mentre que BDNF i NT-4 tindrien efectes sobre les motoneurons. Sembla que el BDNF podria incrementar específicament l'excitabilitat de les motoneurons donat que redueix l'expressió de canals de sodi i potassi, mentre que NT-3 incrementa només l'expressió de canals de potassi i redueix l'excitabilitat de neurones

sensorials (McAllister et al 1999, Chew i Gallo 1999). Totes elles es sintetitzen al múscul esquelètic i es transporten retrògradament cap al soma neuronal de manera que la seva producció està regulada pel grau d'activitat muscular (DiStefano et al 1992, Gonzalez i Collins 1997, McAllister et al 1999). No és descartable que l'excitabilitat no només s'incrementi per la desconexió (desaparició de senyals neurotròfics normals) i retorni per la reconexió nervi-múscul (recuperació d'un volum crític de factors), sinó que l'exposició de l'axó en creixement a determinades combinacions de factors neurotròfics alliberats directament al punt de lesió i al segment distal per part de CS activades (Raivich i Kreutzberg 1994, Verdú i Navarro 1998) puguin modular també l'activitat dels axons aferents i eferents en regeneració. Així la relació H/M resultant podria ser el producte conjunt de canvis evocats per axons que han reinnervat i axons que es troben en regeneració, ambdós exposats a combinacions de factors tròfics diferents segons l'entorn en el qual es troben.

Diversos treballs han demostrat que els canvis funcionals i estructurals produïts per l'axotomia poden començar a involucrar abans de verificar-se la reconexió amb una diana perifèrica (Horch i Lisney 1981, Mendell i Scott 1975). La sinapsi entre les fibres Ia i les motoneurons del reflex d'estirament està mediada per glutamat; l'administració d'antagonistes de receptors de glutamat NMDA i no-NMDA produeixen una abolició dels components tòncics i fàsics dels reflexos (Ziskind-Conheim 1990, Pinco i Lev-Tor 1993). La lesió de les fibres Ia indueix probablement modificacions en l'expressió de canals dependents de lligands de glutamat que podrien explicar també els canvis de l'eficàcia sinàptica (Popratiloff et al 1998). De fet, el bloqueig de receptors NMDA disminueix l'hiperexcitabilitat del reflex miotàtic que produïa rigidesa i espasticitat muscular en un model de parkinsonisme (Ossowska et al 1996). En tot cas, com que la majoria d'estudis s'han centrat en sinapsis entre aferents dels reflexos de retirada i interneurons espinals (Popratiloff et al 1998), abordarem la discussió d'aquest aspecte en l'apartat dedicat als reflexos polisínaptics.

Les nostres dades assenyalen que la reparació creuada (baixa especificitat fascicular) produeix un manteniment de l'hiperexcitabilitat del reflex en el grup de sutura creuada respecte a la sutura directa en el múscul gastrocnemi, mentre que el grup amb tubulització fascicular (elevada especificitat) redueix els nivells de la relació H/M fins a valors semblants als del grup d'injert malgrat assolir nivells menors de reinnervació. Per tant, no es pot deixar d'especular sobre l'efecte de l'especificitat de la reinnervació sobre la involució de l'excitabilitat sinàptica. Així com les variacions en les propietats electrofisiològiques cel·lulars son dependents de la reinnervació d'alguna mena de diana, hi ha estudis que demostren que la recuperació de l'eficàcia sinàptica i de l'excitabilitat normal després de lesions depèn de la qualitat de la reinnervació perifèrica de les aferents sensorials (Mendell et al 1995) i altres que suggereixen que aferents sensorials que equivoquen la diana poden reestablir connexions funcionals i mediar activitat reflexa normal (Nishimura et al 1993, Koerber et al 1995). Els diferents tipus de fibres estudiades i les dianes a les quals van ser forçades a reinnervar expliquen aquesta controvèrsia. Mentre que segons alguns autors les aferents sensorials de receptors cutanis poden reinnervar estructures musculars i generar EPSP en motoneurons (Nishimura et al 1995), d'altres afirmen que encara que una gran quantitat d'aferents reinnerven el fus, la gran majoria no

estableixen connexions funcionals que responguin a l'estirament (Lewin i McMahon 1991a). El llindar d'excitabilitat d'aferents cutànies que reinnerven estructures musculars es mostra per damunt del de les aferents sensorials, sense tendència a l'adaptació. La velocitat de conducció sí que té tendència a incrementar-se cap a valors semblants als de les fibres tipus I (Lewin i McMahon 1991a). Les aferents sensorials musculars dirigides cap a territoris cutanis també reinnerven estructures diana recuperant algunes de les seves propietats biofísiques alterades per l'axotomia com la reobase i la velocitat de conducció fins a nivells semblants dels aconseguits per aferències sensorials del mateix múscul correctament dirigides, encara que inferiors a la de controls intactes (Mendell et al 1995, Koerber et al 1995). Contràriament, al cap d'entre 5 setmanes i 30 mesos de la lesió, l'eficàcia sinàptica del reflex miotàtic evocat per les aferents propioceptives que innerven la pell, es troba clarament disminuïda respecte de les terminals regenerades en el seu múscul original (Mendell et al 1995, Koerber et al 1995). No sembla que les projeccions espinals de les aferents sensorials que es projecten sobre territoris equivocats tinguin capacitat per readaptar la seva funció. En qualsevol cas, les sinapsis amb una correspondència entre la disposició perifèrica d'aferents i eferents neuronals mostren una tendència a reforçar-se respecte a les que reinnerven dianes equivocades, probablement perquè la coherència del patró de descàrregues d'entrada amb el de les motoneurons del reflex és més gran (Koerber et al 1995). Després de la sutura creuada tibial-peroneal, ambdós territoris perifèrics són fonts equiparables de factors tròfics suficients com per induir la involució dels canvis generats per la denervació i proporcionen en tots els casos, dianes motores, sensorials i autonòmiques per tal que la reinnervació de dianes tissulars adequades sigui possible. El manteniment de l'excitabilitat del múscul gastrocnemi (H/M elevada) pot obeir a la innervació per part d'un contingent d'axons menor a l'habitual (del n.peroneal) que podria col·lateralitzar extensament (incrementant el nombre de fibres musculars amb innervació equivocada). El grup de tubulització fascicular presenta una involució dels nivells d'amplitud H/M equivalents als de l'empelt, perquè la gran especificitat de la reinnervació de les dianes musculars i sensorials probablement compensa el dèficit de reinnervació. En tot cas, la involució dels canvis espinals sinàptics depenen d'un compromís entre quantitat (suport tròfic) i qualitat d'innervació (suport tròfic adequat).

#### 4.2.6.3. Increment de les entrades sinàptiques

Diferents estudis dissenyats per correlacionar temporalment la recuperació de l'activitat reflexa amb alteracions en la distribució d'axons de la banya medul·lar posterior i la presència de terminals en les diferents làmines medul·lars han demostrat l'existència, després de lesions centrals (Murray i Goldberger 1974, Thomson et al 1992) i nervis perifèrics (Woolf et al 1992, Shortland i Woolf 1993, Cameron et al 1997), d'un increment de les entrades sinàptiques sobre les motoneurons per col·lateralització de les aferents sensorials. Al mateix temps, tot i la relativa estabilitat de les projeccions espinals de les aferents amb axons perifèrics que reinnerven dianes diferents a les habituals (Koerber et al 1994, 1995), les aferències centrals es projecten per ramificació sobre interneurons en làmines corresponents a la funció del seu axó perifèric (Koerber et al 1994); de manera que finalment, es potencien aquelles sinapsis que mostren una correspondència entre les

senyals d'entrada sensorials i el codi que rep l'element neuronal postsinàptic (Koerber et al 1994, 1995). Les lesions perifèriques indueixen la col·lateralització de terminals mielíniques A $\delta$  i A $\beta$  sobre la làmina II de Rexed, ocupada bàsicament per terminals C, moltes de les quals desapareixen o es retrauen per la lesió. L'increment de les respostes reflexes monosinàptiques es podria explicar per un augment de les connexions de les terminals Ia per col·lateralització terminal, o de projeccions centrals aberrants de neurones sensorials de fibres tipus A $\beta$ , A $\delta$  i C, que directament o per mitjà d'interneurones excitadores de les làmines I-VII, enviarien aferents sobre motoneurones (làmines VIII-IX) o, fins i tot, sobre motoneurones i interneurones de l'hemimedul·la oposada. Cap d'aquestes hipòtesis ha estat ara per ara confirmada sinó al contrari; després de lesions nervioses, les aferents medul·lars mostren un menor nombre de botons sinàptics i de menor diàmetre que els animals control. En canvi, el registre del potencial medul·lar dorsal demostra una amplitud semblant als animals no operats, fet que indica que la seva eficàcia individual és superior (Koerber et al 1994). La reinnervació perifèrica permet una recuperació de la connectivitat espinal, però reorganitzada, de manera que les fibres Ia, Ib i II amb activitat propioceptiva muscular o articular estableixen la seva majoria de sinapsis sobre les làmines IX, V-VII i IV-V respectivament, encara que també envien algunes col·laterals amb làmines no corresponents (III-V). Les aferents cutànies tipus A $\beta$  projecten sobre les làmines III i IV però donen col·laterals abundants a les làmines I i II (Koerber et al 1994). Si bé són difícils de demostrar canvis estructurals que demostrin un increment de les aferències sobre les motoneurones, sí que s'ha mostrat que les aferències Ia que reinerven la pell generen una activitat sinàptica incrementada (Lewin i McMahon 1991b, Koerber et al 1994).

El reflex monosinàptic podria desencadenar-se per una font d'estimulació cutània amb un patró de descàrrega bioelèctrica diferent a l'original, que facilitaria la sinapsi i explicaria l'increment de la relació H/M. D'aquesta manera, els grups amb més errors de reinnervació de fibres Ia projectades sobre la pell mantindrien permanentment aquesta situació. Encara que la reinnervació aberrant perifèrica de fibres propiceptives explicaria alguns dels canvis de l'activitat sinàptica espinal, no justifica la magnitud d'un fenomen que es produeix fins i tot quan la majoria de fibres Ia reinerven fusos musculars. La lesió perifèrica comporta al mateix temps el desencadenament d'activitat aferent de fibres C, que ha estat assenyalada com la responsable de la sensibilització espinal i la producció del dolor neuropàtic. Les aferents nociceptives musculars tenen capacitat d'incrementar l'excitabilitat i facilitar reflexos espinals polisinàptics (Wall i Woolf 1984). Recentment s'ha vist que un estímul de dolor redueix el llindar d'excitabilitat del reflex d'estirament i incrementa l'amplitud dels seus components tònic i fàsic (Matre et al 1998). No és descartable que l'activitat aferent produïda en fibres C per la lesió, i matinguda pel contacte dels axons regeneratius amb teixit connectiu i l'excitació creuada en neuromes entre fibres A i C (Amir i Devor 1992, Matzer i Devor 1994) puguin causar a través de canvis presinàptics i postsinàptics dels receptors de glutamat, la facilitació sinàptica (Ossokowska et al 1996, Popratiloff et al 1998) que promogui la hiperactivitat dels reflexos espinals. En acord amb aquesta hipòtesi, s'ha demostrat que les fibres sensorials mielíniques d'origen muscular tenen més tendència a esdevenir mecanosensibles i generar activitat aferent espontània que les sensorials cutànies (Tal et al 1999).

#### 4.2.6.4 Bloqueig de circuits descendents i locals reguladors de l'excitabilitat

L'estirament d'un múscul genera un senyal que es projecten sobre motoneurons del múscul estimulat (reflex homònim) i dels seus corresponents sinèrgistes (reflex heterònim). Al mateix temps i per mitjà d'una interneurona inhibidora glicinèrgica, s'inhibeix l'activació de motoneurons corresponents a la musculatura antagonista. Aquesta interneurona pot ser estimulada per fibres descendents per tal de regular l'abast de l'activació de sinèrgistes i la inhibició d'antagonistes (Pratt i Jordan 1987, Hultborn et al 1987, Floeter 1998). A més, altres projeccions descendents poden desencadenar directament la despolarització presinàptica d'aferents primàries Ia i II mitjançant sinapsis GABAèrgiques i disminuir la facilitació de la resposta davant d'estímuls d'estirament del fus. L'activitat dels circuits inhibidors de les interneurons de Renshaw, l'excitabilitat de les quals està regulada per projeccions descendents GABAèrgiques i glicinèrgiques constitueix un altre sistema de regulació motoneuronal (Hultborn et al 1998). Com que la lesió perifèrica té com a primera conseqüència una involució de l'arbre dendrític de neurones motores i sensorials amb una reducció del nombre de sinapsis, circuits segmentaris com els que produeixen el reflex miotàtic queden aïllats de les possibles influències de projeccions descendents (Sumner i Watson 1971, Havton i Kellerth 1990, Brännstrom et al 1992a, Pastor et al 1997). Aquest alliberament disminueix l'activitat inhibidora no només de les projeccions descendents, sinó també dels circuits locals, facilitant la producció de la resposta. Diversos treballs han demostrat que la secció medul·lar toràcica produeix, després d'una primera fase d'abolició de la resposta H, un increment de la relació d'amplitud H/M i una disminució del llindar d'evocació de la resposta i un reclutament accelerat de l'amplitud de l'ona H (Collins et al 1984, Thomson et al 1992). Aquests canvis s'han atribuït a l'abolició dels mecanismes locals i descendents encarregats de regular l'excitabilitat de l'arc reflex monosinàptic. En humans postnatsals amb un sistema de control descendent encara immadur, és possible l'obtenció de respostes H en músculs que no l'evoquen en adults (Fisher 1992). Després de lesions centrals, l'alteració de la capacitat per regular els llindars d'excitabilitat de les sinapsis Ia i Ib explicarien la hiperreflèxia i les alteracions del control motor segmentari (Levin i Feldman 1994). No hi ha evidències directes de degeneració d'interneurons espinals amb lesions nervioses, però sí que s'ha demostrat una reducció de la immunofluorescència a calbindina respecte d'animals controls en cèl·lules de Renshaw entre els 7 dies i les 8 setmanes posteriors a una compressió del nervi ciàtic (Sanna et al 1993). Increments en fases inicials postlesió de l'expressió de calbindina en motoneurons han estat interpretats com una potenciació dels mecanismes per amortir l'entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  dins de la cèl·lula i evitar la mort induïda per aquest ió (Dassesse et al 1998). En aquest cas podria significar també una disminució per falta d'activitat de la motoneurona que l'activa.

Concomitantment amb la reinnervació perifèrica (Mendell i Scott 1975, Brännstrom et al 1992b) o amb la regeneració distal (Horch i Lisney 1981) la neurona recupera l'extensió del seu arbre dendrític i reestableix un patró de connexions amb circuits locals i projeccions descendents. A mesura que les aferències tornen a rebre terminals inhibidores, el control sobre l'excitabilitat de la sinapsi retorna i es redueix l'increment de la relació d'amplituds H/M. Així, la recuperació de l'activitat local de regulació

que és fonamental per al reclutament del nombre i tipus d'unitats motores segons les característiques del moviment (Levin i Feldman 1994, Simonsen i Dyhre-Poulsen 1999) depèn del reestabliment d'un patró de connexions apropiat i sobretot del grau i la qualitat de la reinnervació perifèrica (Mendell 1984). Aquesta observació es concorda amb el fet que els grups experimentals amb resecció o el grups musculars més distals (plantars), amb una dinàmica de reinnervació més lenta i dificultada, presentin una menor recuperació de la relació d'amplituds H/M.

### 4.3. Reflexos espinals polisinàptics

Els reflexos polisinàptics de les extremitats són elements fonamentals per al desenvolupament de l'activitat locomotora. Estan conformats per aferents sensorials de tipus A $\beta$ , A $\delta$  o C i eferents d'a-motoneurons d'activitat flexora o extensora segons les característiques del reflex. La neurona aferent i eferent no sinapten directament, sinó que ho fan a través d'una àmplia xarxa d'interneurons que cobreixen la distància existent entre els nivells d'arribada a la banya dorsal espinal (làmines I-V de Rexed) i la localització de les motoneurons (làmines VIII-IX). Presenten una distribució espacial musculotòpica, extremadament organitzada, que posa en connexió determinades regions receptives amb respostes de grups musculars específics (Woolf i Swett 1984, Schouenborg et al 1995, Koerber et al 1995, Holmberg i Schouenborg 1996a, 1996b).

A diferència del circuit de la ona H homosinàptica de l'apartat anterior, el registre de l'activitat reflexa de retirada no està condicionat per l'estat de la motoneurona eferent, donat que s'ha mesurat en músculs que tant en els reflexos contralaterals com ipsilaterals no depenen del nervi lesionat. Aquest fet permet estudiar el nivell de recuperació de l'activitat d'aferents i de les sinapsis espinals de manera directa sense haver de normalitzar els valors d'amplitud del reflex respecte de la resposta muscular total, que no varia. D'altra banda, com que s'ha estimulat el nervi tibial per sota del nivell de lesió, per estudiar l'excitabilitat de la resposta s'han normalitzat els valors d'amplitud màxima del reflex per l'amplitud del nervi tibial en aquell punt.

#### 4.3.1. Reflexos polisinàptics en animals controls

En acord amb treballs previs, l'estimulació d'aferents cutànies o del tronc nerviós del nervi ciàtic al taló evoca respostes reflexes ipsilaterals de flexió als músculs bíceps femoris, semitendinos, peroneal lateral llarg i extensor llarg dels dits (Sherrington 1910, Wall i Woolf 1984, Woolf i Swett 1984, Wall i Woolf 1986, Laird et al 1993, Schouenborg et al 1995, Meyerson et al 1995, Ren et al 1996, Holmberg et al 1996, Gozariu et al 1997, Gregoric et al 1997), i respostes contralaterals de flexió i extensió als músculs quàdriceps, gastrocnemi, tibial anterior i plantar (Clare i Landau 1975, Navarro et al 1996, Navarro et al 1999, Lázaro et al 1999). Tot i que el model sherringtonià definia que l'estimulació de receptors nociceptius produïa l'activació de músculs flexors del costat ipsilateral i extensors del contralateral, les nostres dades mostren que en la pota contrària es produeix simultàniament l'activació de musculatura extensora i flexora. Aquest fenomen, que també ha estat detectat per diferents autors (Graham-Brown i Sherrington 1910, Woolf i Sweett 1984) és

probablement degut a la necessitat de controlar el moviment d'extensió creuat (que és el que mostra l'amplitud més elevada) amb la contracció de la musculatura antagonista. Les nostres dades assenyalen que l'amplitud dels components C1, C2 i C3 del reflex extensor creuat és superior a la del flexor creuat. Els nostres estudis en controls mostren en un 50% dels animals estudiats l'aparició d'un component únic d'activitat reflexa sobre el múscul plantar contralateral (no apareix en el reflex flexor ipsilateral) que ha estat definit com un múscul extensor i flexor a la vegada (Clare i Landau 1975), però que per la seva baixa freqüència d'aparició no ha estat analitzat en els grups experimentals.

A excepció del múscul plantar contralateral, tots els reflexes presenten tres components d'activitat que apareixen amb latències successives (C1, C2 i C3), amb diferents durades i llindars d'excitabilitat creixents. En funció del temps de latència i el llindar d'estimulació, s'han tipificat aquests components com a mediats per aferents Ab (C1), Ad (C2) i per fibres C (C3) (Clare i Landau 1975, Woolf i Swett 1984, Wall i Woolf 1984, Wall i Woolf 1986, Meyerson et al 1995, Ren et al 1996). Per assegurar que s'ha obtingut la màxima resposta, tots els components han estat evocats amb estímuls de 500 µs de duració i entre 40 i 75 mA d'intensitat, nivells molt superiors als llindars mínims i a l'entorn dels estímuls utilitzats en altres treballs (Wall i Woolf 1984, Woolf i Swett 1984, Svendsen et al 1997, Sandkühler i Liu 1998). La facilitat d'evocació dels diferents components de cada reflex, tot i ser presents en la majoria dels casos, mostra certes diferències. El reflex flexor té components més fàcilment evocables que els creuats extensor i flexor. A més, els components C1 i C3 dels reflexos creuats solen no ser evocables en un 10% i un 7% dels animals controls, mentre que C2 és el més consistent de tots ells. En acord amb aquesta observació, altres autors han indicat dificultats per evocar C1 en animals profundament anestesiats, i fins i tot en un 20% d'animals sota anestèsia lleugera (Ren et al 1997, Meyerson 1995).

El component C1 té l'amplitud més elevada i està representat per un únic pic d'activitat amb una durada de 3 ms, seguit per C2 que mostra una amplitud entre un 50-80% inferior a l'anterior, un nombre de pics superior i una durada més llarga (Woolf i Swett 1984, Ren et al 1996). C3 té una amplitud semblant a la de C2, però una durada molt més llarga i un nombre de pics d'activitat més nombrós en part degut a que dóna lloc en algunes motoneurons a descàrregues repetitives (Wall i Woolf 1984, Woolf i Swett 1984, Wall i Woolf 1986). Per a la interpretació de resultats, cal tenir en compte que l'amplitud i el nombre de pics dels components C1 i C2 donen una idea de la resposta composta de les diferents unitats motores activades (que poden integrar-se diverses en un sol pic) per aferents Ab i Ad respectivament. Per contra C3, mostra una activitat més desincronitzada, de manera que el nombre de pics estima més exactament el nombre d'unitats motores activades, mentre que l'alçada màxima del component dóna una idea de l'amplitud de la unitat motora més gran activada. Els estudis realitzats en models semblants han utilitzat indistintament o bé el nombre de pics absolut (Laird et al 1993, Wall i Woolf 1984, Svendsen et al 1997), el nombre de pics per unitat de temps (Woolf i Swett 1984, Holmberg i Schouenborg 1996a, Yakhnitsa et al 1999, Andrew i

Greenspan 1999), l'amplitud màxima del component (Gregoric 1998, Navarro et al 1996, Navarro et al 1999, Lázaro et al 1999, Sandkuüler i Liu 1998), o l'àrea sota la corba d'amplitud/temps.

El seguiment mensual d'un grup d'animals control al llarg de 3 mesos ha confirmat que el conjunt de proves que conformen el seguiment de la regeneració i la reinnervació nerviosa (electrofisiologia, algesimetria, estimulació sudomotora i *walking track*) no alteren per si mateixes l'activitat reflexa. L'estimulació elèctrica mensual suprallindar necessària per obtenir els registres dels PAMC i els PANC (aproximadament 14 estímuls per pota d'entre 4-8 mA d'intensitat i 100 µs durada) o per registrar les respostes reflexes extensores i flexores (10 estímuls per pota d'entre 50-75 mA d'intensitat i 500µs de durada) i l'estimulació termoalgèsica (6 estímuls per pota d'entre 35-54 °C) no modifiquen apreciablement l'excitabilitat dels circuits espinals. La facilitació sinàptica espinal per estimulació elèctrica requereix de trens d'estimulació múltiples amb freqüències superiors a 0,5-2 Hz durant 30 segons per produir la més curta i menys intensa de les sensibilitzacions que dura de l'ordre de minuts (Mendell i Wall 1965, Wall i Woolf 1986, McMahon i Wall 1993). Dels resultats obtinguts s'observa un manteniment consistent de l'estimació de la latència espinal, l'amplitud de la resposta màxima i el nombre de pics respecte al dia inicial en els diferents intervals de seguiment.

#### 4.3.2. Recuperació de respostes reflexes polisinàptiques després de lesions

Les nostres dades mostren que en general 90 dies són suficients en els grups experimentals de compressió, secció i resecció per recuperar en la majoria d'animals alguna mena de respostes reflexes polisinàptiques. Aquest fet demostra en acord amb d'altres autors que ja sigui per regeneració dels axons afectats o col·lateralització perifèrica (Navarro et al 1994) o central (Woolf et al 1992) d'aferents intactes o afectades, s'aconsegueix generar un patró de connexions que permeten com a mínim mediar respostes polisinàptiques (Lewin i McMahon 1991a, 1991b, Nishimura et al 1993, Koerber et al 1994, Mendell et al 1995, Koerber et al 1995). Com ja s'ha esmentat per al reflex monosinàptic, la reinnervació específica de dianes regionalment idèntiques a les originals (Koerber et al 1994, Koerber et al 1995) ni tant sols tissularment específiques (Lewin i McMahon 1991b, Nishimura et al 1993, Mendell et al 1994) no és un requisit indispensable perquè les noves aferències tinguin capacitat per induir respostes reflexes. Fibres aferents originalment cutànies poden reinnervar fusos musculars i continuar mediant respostes reflexes polisinàptiques (Lewin i McMahon 1991a). Al mateix temps, aferents Ia o Ib poden projectar-se sobre receptors cutanis i mantenir les seves propietats per conduir respostes reflexes monosinàptiques (Mendell et al 1995, Lewin i McMahon 1991b). Aquesta observació és coincident amb el fet que els grups sotmesos a reseccions i amb una major probabilitat d'innervació aberrant no per això presenten al final del seguiment proporcions de recuperació de respostes reflexes inferiors. És més, el grup de sutura creuada mostra al final del seguiment nivells de recuperació general dels reflexes polisinàptics coincidents amb els de la resta de grups de secció.

La recuperació dels reflexes polisinàptics comença en alguns animals de cada grup abans que es pugui detectar un PANC del nervi tibial al taló. Aquest fet paradoxal és atribuïble a que l'elevada

intensitat utilitzada per estimular les fibres C regeneratives (50-75 mA) genera un camp elèctric d'una àrea àmplia que estimula probablement aferents que es troben proximals al punt d'estimulació. A més, la no detecció del PANC del nervi tibial al taló no descarta que hi pugui haver axons regenerats (preferentment de petit tamany) que hagin arribat aquest punt però que no produeixen un senyal composta suficientment gran ni prou homogeni com per generar un potencial detectable.

Si bé la recuperació de respostes reflexes és generalitzada en tots els animals de cada grup al final del seguiment, no tots els components es recuperen de la mateixa manera. La recuperació de l'amplitud i del nombre de pics dels components C1 i C2 supera àmpliament els valors preoperatoris, fet que indica que la reconexió espinal que es produeix després d'una lesió perifèrica dóna lloc a un circuit hiperfuncionant, de tal manera que davant d'estímuls de similar intensitat dóna lloc a respostes de major amplitud i de més duració que les normals (Valls-Solé i Tolosa 1989, Woolf i King 1990, Navarrete et al 1990, Valls-Solé et al 1992, Cossu et al 1999, Andrew i Greenspan 1999). Per altra banda, el component mediat per fibres C (C3) mostra una recuperació més lenta de la latència espinal, l'amplitud i el nombre de pics que C1 i C2. Aquestes diferències no deixen de ser paradoxals, donat que les fibres C són les que en estudis de reinnervació perifèrica presenten la regeneració més ràpida la major capacitat de col·lateralització (Wisensfeld-Hallin et al 1988, 1989, Navarro et al 1994). La mort preferent de cèl·lules sensorials de petit tamany més sensibles a l'axotomia es compensa distalment amb la col·lateralització profusa dels axons restants, però deixa un espai vacant a nivell espinal (làmines I-II de Rexed), que demostra que aquest tipus de neurones ha perdut part de les seves projeccions centrals (Swett i Woolf 1985, Shortland i Fitzgerald 1994). La col·lateralització posterior d'aferents centrals Ab i Ad sobre les làmines I i II (Melville et al 1984, Nothias et al 1993, Himes and Tessler 1989, Groves et al 1997), explica que els components C1 i C2 mostrin la recuperació més consistent i ràpida donat que tenen més probabilitat d'establir connexions amb un nombre més gran d'interneurones espinals (Woolf et al 1992, Shortland i Woolf 1993, Koerber et al 1994, Shortland i Fitzgerald 1994, Lekan et al 1996). Els grups de resecció mostren les proporcions més baixes de recuperació del component C3, ja que per la severitat de la lesió i el llarg temps de desconexió d'òrgans diana, els axons es troben deprivats de factors tròfics durant més temps. Al mateix temps, la baixa proporció de recuperació d'aquest mateix component en el grup de sutura creuada pot explicar-se perquè un nombre més gran d'axons sensorials que es troben al fascicle tibial (4.700 axons sensorials) són redirigits al fascicle peroneal de menor cal·libre (2.600 axons sensorials), dificultant la regeneració. En tot cas, no deixa de ser paradoxal que les aferents C tinguin una gran capacitat de col·lateralització i regeneració del seu procés perifèric i no de la seva aferent espinal. Alguns autors han detectat col·lateralització central de fibres C procedents de nervis intactes (com el nervi safè) sobre els nivells medul·lars del ciàtic seccionat (Shortland i Fitzgerald 1994), cosa que en el nostre cas no ha pogut ocórrer donat que per evitar la reinnervació col·lateral perifèrica prèviament s'ha resecat el nervi safè.

#### 4.3.3. Alteració del temps de conducció espinal

L'estimació del temps de trànsit perifèric-espinal dels circuits polisinàptics creuats s'ha efectuat restant al temps de latència de cadascun dels components el temps de latència del PANC del nervi tibial (via aferent) i el temps de latència del PAMC dels músculs gastrocnemi o tibial anterior de la pota contralateral (via eferent). L'estimació resultant correspon al temps de conducció des de la fenedura ciàtica del costat estimulat a través de la sèrie d'interneurons corresponents fins la fenedura ciàtica del costat de registre i que, per tant, conté un trajecte aproximat de 4 mm (2 mm+2 mm) a nivell perifèric. Dels tres components estudiats C3 presenta la pitjor estimació del temps espinal donat que la latència del PANC tibial utilitzada en els càlculs depèn de fibres  $A\alpha\beta$ , que condueixen potencials d'acció a una velocitat molt més ràpida que les C. Les dades mostren, a partir del moment en què es comença a registrar una resposta reflexa, un lleuger increment del temps de conducció espinal (20-30% per a C1 i C2, 40-55% per a C3) que disminueix dràsticament a mesura que progressa la reinnervació sensorial del costat operat, fins a valors finals propers als originals. Els component C3 presenta la pitjor recuperació al final del seguiment però no es troben diferències significatives entre cap dels components pels reflexos estudiats. Crida l'atenció que la recuperació del temps espinal dels reflexes monosinàptics (ona H), per a grups equivalents, és sempre pitjor que la dels components C1 i C2 i a vegades C3 dels polisinàptics. Com ja s'ha esmentat, no només per la desmielinització sinó també per modificacions de les propietats cel·lulars, les lesions perifèriques produeixen una disminució de la velocitat de conducció proximal de fibres sensorials mielíniques i amielíniques (Horch i Lisney 1981, Gallego i Adrover 1990, Lewin i McMahon 1991a, 1991b), que afectaria un segment reduït en direcció espinal des del punt de lesió (Crag i Thomas 1961, Fu i Gordon 1997). En tot cas, la ràpida recuperació de l'estimació del temps de latència espinal suggereix que aquest està més influït pel temps de transmissió sinàptica central que per la conducció axonal perifèrica postaxotomia. Alguns treballs amb un model similar de lesió i de registre no han trobat en animals postnatsals després d'una secció, modificacions significatives de la latència de reflexos polisinàptics desencadenats per estímuls tèrmics, tàctils i dolorosos (Holmberg i Schoenborg 1996) en un període de 21 dies. D'altres mostren un allargament molt lleuger de la latència de la resposta (Navarrete et al 1990). En tot cas, manquen estudis que aclareixin les característiques funcionals de la xarxa d'interneurons que separen els elements aferents i eferents de cada reflex i la seva reorganització després de lesions perifèriques.

#### 4.3.4. Facilitació dels reflexos espinals polisinàptics

Quan es tenen només en compte els animals que mostren recuperació dels diferents components dels reflexos i es normalitza la seva amplitud màxima pel coeficient de reinnervació del nervi tibial al taló, s'observa que l'amplitud relativa se situa molt per damunt dels valors originals i disminueix a mesura que té lloc la reinnervació distal. Aquesta hiperexcitabilitat de les respostes reflexes, que és més marcada per C1 i C2 i limitada per a C3, ja ha estat observada en diferents models i s'ha relacionat amb dificultats per recuperar les funcions globals motores en les quals aquests circuits participen (Valls-Solé i Tolosa 1989, Woolf i King 1990, Navarrete et al 1990, Valls-Solé et al 1992, Cossu et al 1999, Andrew i Greenspan 1999). La facilitació de reflexos espinals polisinàptics mediat per

fibres aferents A $\beta$ , A $\delta$  i C, interneurons espinals i motoneurons, es pot explicar per analogia a la del circuit del reflex monosinàptic a partir de tres processos bàsics: modificacions estructurals i funcionals de la connectivitat espinal, increment de l'excitabilitat cel·lular i sinàptica i decreixement dels sistemes inhibidors locals i descendents que actuen sobre els arcs reflexos (McMahon et al 1993, King i Thomson 1995, Baranauskas i Nistri 1998). Aquestes variables han estat molt estudiades a l'entorn del problema del dolor d'origen neuropàtic, provocat per modificacions de la connectivitat espinal i l'excitabilitat de circuits medul·lars reflexos. Les interneurons de la banya medul·lar posterior incrementen les seves respostes en front a descàrregues continuades d'una determinada freqüència (superior a 0,5 Hz) aplicades sobre aferents amielíniques i mielíniques. Aquest increment persisteix durant llargs períodes de temps després de l'estimulació (Mendell i Wall 1965, Wall i Woolf 1986). L'estimulació d'aferents C procedents del múscul resulta més potent que la d'altres aferents sensorials cutànies per provocar la facilitació del reflex de flexió (Wall i Woolf 1984, Wall i Woolf 1986). S'ha buscat una relació entre l'efecte facilitador d'estímuls de freqüències elevades aplicades sobre aferents mielíniques i amielíniques intactes i els efectes de lesions perifèriques. El contacte dels cons de creixement dels axons sensorials seccionats amb el teixit connectiu cicatricial de la zona de lesió, que constitueix una barrera física a l'avançament de la regeneració, provoca la seva despolarització continua a una freqüència de descàrrega similar a la qual, en models experimentals, s'indueix "*wind up*" d'interneurons espinals i la facilitació de reflexos (Devor i Wall 1976, McMahon et al 1993, Devor 1994, Tal et al 1999).

Existeixen evidències d'excitació creuada entre fibres A $\beta$ -A $\delta$  i C (especialment de les aferents amielíniques sobre les mielíniques) a nivell de terminals d'un neuroma que contribuiria a l'increment de l'activitat aferent d'origen ectòpic sobre la medul·la espinal i que es postula està produïda per l'alliberament al medi neural de neurotransmissors o per canvis en l'equilibri iònic local (Amir i Devor 1992). La continuïtat i ritmicitat de l'activitat aferent que es dona després de lesions depèn de canvis en l'expressió i la funció de canals dependents de voltatge, principalment de Na<sup>+</sup> i en menor mesura de Ca<sup>2+</sup> (Devor et al 1992, Matzner i Devor 1994). Alguns treballs recents, estableixen una base perifèrica a la facilitació o hipereflexia espinal. Nociceptors i mecanoreceptors regenerats mostren una hipersensibilitat mecànica a estímuls suprallindar aplicats sobre la pell respecte de receptors cutanis controls (Andrew i Greenspan 1999). Les nostres dades demostren que estimulants directament les vies aferents es recullen també respostes superiors a les controls, fet que demostra que, si bé l'hipersensibilització del receptor reinnervat pot participar-hi, no és aquest l'únic fenomen causal.

Els nostres resultats són concordants amb els estudis sobre facilitació espinal de respostes reflexes obtinguda per estimulació amb freqüències de 0,5-3 Hz (Mendell i Wall 1962, Wall i Woolf 1984, Wall i Woolf 1986). La facilitació de l'activitat reflexa després de lesions perifèriques no es limita als components mediat per fibres C (Sandkühler i Liu 1998), sinó que també es produeix per als components mediat per fibres mielíniques Ab i Ad (Svendsen et al 1997). Aquesta facilitació ha estat demostrada com un increment de l'amplitud del potencial de camp espinal per estimulació

tetànica perifèrica (100 Hz) (Sandkühler i Liu 1998) o de l'excitabilitat de neurones sensorials polimodals en termes de freqüència de descàrregues respecte a valors preestimulació després d'estimulació tetànica (100 Hz) (Svendsen et al 1997). Les nostres dades, però, posen de manifest que el component C3 és, després de lesió i regeneració perifèriques, el que presenta menys evidències de facilitació, fet atribuïble a la major mort de neurones sensorials petites i a la seva limitada capacitat per col·lateralitzar centralment. El llinar d'estimulació de les aferents sensorials no varia després d'estimulació d'elevada freqüència, assenyalant que la facilitació de respostes no es produeix en aquest model per alteracions de les propietats biofísiques de la membrana sinó més aviat per canvis sinàptics (Svendsen et al 1997), mentre que la lligadura o la secció nerviosa produeixen un descens reversible del llinar d'excitabilitat dels components C1, C2 i C3 (Meyerson et al 1995, Ren et al 1996). Les nostres dades no són del tot comparables amb alguns dels estudis citats donat que han estat obtingudes després de lesions i no per estimulació elèctrica (Wall i Woolf 1984, Wall i Woolf 1986, Sandkühler i Liu 1998, Svendsen et al 1997) o química (Woolf i King 1990) del nervi perifèric. Al mateix temps, molts dels estudis realitzats en models de lesió s'han desenvolupat en parells cranials que presenten diferents tipus de reflexos polisínàptics (Valls-Solé 1989, 1992, Cossu et al 1999). Les nostres dades d'amplitud mostren que el component C1 presenta els nivells més elevats d'hiperresposta al llarg del seguiment (200-600% del valor preoperatori), seguit del C2 (150-400%) i finalment de C3 (100-250%). En altres estudis, la resposta màxima aconseguida pel reflex flexor oscil·la per a fibres A $\beta$  i A $\delta$  entre 300-700% del valor control en lesions nervioses en adults (Navarrete et al 1990), entre 190-200% en animals lesionats postnatalment estimulats amb estímuls fisiològics tèrmics i tàctils sobre la pell (Holmberg i Shouenborg et al 1996) i entre 180-200% en animals adults postestimulació elèctrica del nervi ciàtic (Svendsen et al 1997). Les respostes mediades per fibres C augmenten a nivells màxims del 200 al 300% en animals adults amb l'estimulació elèctrica repetida, registrant directament sobre les aferents medul·lars (Svendsen et al 1997, Sandkühler i Liu 1998) o bé el reflex en músculs flexors (Wall i Woolf 1986), però no varien respecte als valors preoperatoris en animals lesionats postnatalment amb estimulació fisiològica dels receptors i registre muscular (Holmberg i Shouenborg et al 1996). L'augment d'excitabilitat del component mediat per fibres C apareix en models on s'ha induït la sensibilització espinal per estimulació i no per lesió axonal, que produeix alteracions sobre la població neuronal.

Els components reflexes C1 i C2, corresponents a fibres A $\beta$  i A $\delta$  respectivament, mostren en acord amb d'altres treballs (Meyerson et al 1995) nivells de facilitació més elevats, perquè corresponen a fibres que després de lesions tenen més capacitat de col·lateralització espinal i de desenmascament de connexions amb interneurons de làmines diferents sobre les quals originalment es projecten (Mendell i Wall 1962, Woolf i Shortland 1992). De manera semblant a la potenciació a llarg terme (LTP) en hipocamp, la sensibilització espinal produeix un increment de l'excitabilitat sinàptica per un augment en la sensibilitat de receptors possinàptics i/o de la probabilitat d'alliberament de neurotransmissor regulats per canvis en l'expressió de receptors de glutamat NMDA i no-NMDA, i metabotròpics, receptor NK-1 i el seu agonista la SP, i diferents cadenes de transducció de senyals

mediades per proteïnaquines i òxid nítric, així com una reducció de la sensibilitat dels receptors GABA<sub>A</sub> i glicina (Willis 1997).

#### *4.3.5. Hipòtesis per explicar modificacions de l'excitabilitat espinal polisinàptica*

En condicions normals, l'eficàcia de les múltiples sinapsis entre la neurona sensorial aferent i la motoneurona eferent està regulada per fenòmens locals sinàptics (nombre i tipus de receptors, nivells i tipus de transmissors i moduladors) (Hötkfeld et al 1994), i l'acció de circuits locals (Biella et al 1994) i descendents (Castro-López 1993, 1995). La lesió produeix alteracions de tots aquests mecanismes que es readapten després de la reinnervació segons la gravetat de la lesió i l'eficàcia i qualitat de la regeneració. Canvis estructurals i funcionals de la connectivitat entre les aferents i les interneurons, modificacions en l'expressió i l'alliberament de neuropèptids, alteracions dels circuits inhibidors locals i descendents i finalment, l'increment de l'excitabilitat sinàptica per fenòmens de reorganització de receptors podrien explicar la facilitació dels reflexos polisinàptics després de lesions perifèriques. Tot el conjunt de canvis sobre les propietats biofísiques, alteracions en l'expressió de canals i de l'excitabilitat cel·lular després de lesions i l'efecte de factors tròfics (Mendell 1984, Chew i Gallo 1999, McAllister 1999) són aplicables també als reflexos polisinàptics, per tant no es comentaran aquí en relació a les dades dels reflexos polisinàptics.

##### *4.3.5.1. Canvis estructurals i de la connectivitat*

Les lesions perifèriques de lligadura, compressió o secció desestructuren el normal patró de projeccions medul·lars de les diferents aferents sensorials primàries i produeixen la col·lateralització de terminals mielíniques A $\beta$  i A $\delta$  sobre la làmina II i també secundàriament en I, ocupades normalment per terminals C. Moltes de les quals desapareixen o es retrauen per la lesió. Aquest *sprouting* fa que molts estímuls de naturalesa tèrmica, tàctil o de desplaçament de foliculs pil·losos generen corticalment sensacions doloroses continuades i l'alodínia al tacte, el fred i la calor mediada per aferents del tipus A $\beta$  i A $\delta$  (Woolf et al 1992, Shortland i Woolf 1993, Koerber et al 1994, Shortland i Fitzgerald 1994, Lekan et al 1996). Tot i la mort d'abundants neurones sensorials petites s'ha demostrat la col·lateralització de les fibres C de les neurones restants cap a làmines més ventrals medul·lars II i III (Shortland i Fitzgerald 1994) encara que en menor extensió que les fibres A $\beta$ . Les lesions perifèriques poden induir, especialment si són greus i l'extrem proximal triga a establir connexió amb una font de factors tròfics que asseguri la seva supervivència, la mort neuronal preferentment de cèl·lules sensorials i corresponents a aferents sensorials petites (Melville et al 1984, Nothias et al 1993, Himes and Tessler 1989, Groves et al 1997). Concordantment, les nostres dades demostren que el component C3 dels diferents reflexos estudiats i que està mediat per fibres C és el que pitjor es recupera. La col·lateralització de fibres A $\beta$  té lloc tant si s'obstacul·litza la regeneració com en lesions de compressió, i es manté fins i tot quan s'ha assolit la reinnervació perifèrica encara que amb tendència a la reducció (Woolf et al 1995). Aquestes col·laterals envaeixen les làmines dels segments medul·lars que els corresponen, mantenint la seva somatotopia original (Shortland i Fitzgerald 1994). Al mateix temps, s'ha demostrat que la col·lateralització d'aferents espinals A $\beta$  i C de neurones intactes del nervi safè en regions veïnes deaferentitzades després de la

secció del nervi ciàtic (Shortland i Fitzgerald 1994). En tot cas les lesions perifèriques estimulen d'una banda la col·lateralització de terminals espinals de les neurones afectades, així com les de neurones sensorials no afectades per la lesió però de projeccions adjacents. El resultat d'aquest doble efecte és un major nombre d'aferents sensorials, reorganitzades, de tipus A $\beta$ , A $\delta$  i C, procedents de la col·lateralització central de fascicles nerviosos lesionats i la proliferació de branques d'aferents intactes coadjacents, el que incrementa el nombre de botons sinàptics sobre les interneurons principalment de les làmines I i II i secundàriament III, IV i V (Shortland i Fitzgerald 1994, Koerber et al 1994). Aquestes reben un nombre de senyals d'entrada superior i arriben més fàcilment al llindar que genera un potencial d'acció desencadenant el reflex. Per altra banda, les interneurons connecten entre si diferents làmines de la banya dorsal medul·lar (per exemple les làmines I i V) i s'observa una seqüència d'activació després d'un estímul perifèric. En animals control existeix una relació extremadament fina entre les característiques temporals de freqüència i durada del senyal aferent i la sensibilitat de la interneurona postsinàptica, que es perd després d'una lesió perifèrica (Biella et al 1997). Aquestes connexions interlaminars quedarien funcionalment inhibides per la manca de coherència entre les característiques dels senyals d'entrada i la receptivitat de les interneurons i alterarien el control i la modulació de l'activitat reflexa polisinàptica.

#### 4.3.5.2. Modificacions en el patró d'expressió de neuropèptids

Després de lesions axonals perifèriques, s'han descrit una gran quantitat de canvis en l'expressió de diferents neuropèptids i neurotransmissors de neurones sensorials, motores i simpàtiques. En general les neurones axotomitzades que han activat el seu programa de "regeneració" redueixen l'expressió de neurotransmissors (Fu i Gordon 1997). En neurones sensorials s'ha descrit la disminució en l'expressió i el nombre de somes cel·lulars immunoreactius a substància P (SP), somatostatina (SOM), una disminució del CGRP en lesions de rizotomia però no perifèriques, i, per contra, un increment de galanina (GAL), NPY sobre les làmines III i IV i VIP en les làmines I i II (Hirakawa i Kawata 1992, Nothias et al 1993, Hökfelt et al 1994, Cameron et al 1997). En animals intactes CGRP i GAL es localitzen especialment en projeccions espinals de les làmines I-II de Rexed i s'expressen específicament en motoneurons després de lesions de l'arrel ventral medul·lar, les fibres SP positives es projecta sobre les làmines I, II i també VI, les de NPY en la II i la IV, i les de VIP sobre les làmines I i II. A més, SP, GAL i NPY s'expressen també en interneurons de les làmines de projecció (Hirakawa i Kawata 1992, Hökfelt et al 1994, Zhang et al 1995). La regeneració distal restitueix els nivells de síntesi de SP i CGRP fins als normals en lesions postnatales i de manera incompleta en adults, gràcies a la recuperació de les neurones que sobreviuen a la lesió (de l'ordre del 50% de les SP i CGRP positives en animals postnatales) i a la col·lateralització de neurones cel·lulars adjacents intactes (Hirakawa i Kawata 1992, Nothias et al 1993, Cameron et al 1997). Temporalment, la disminució de l'expressió de SP en el soma, que podria ser secundària a un increment de l'alliberament espinal, és el paràmetre que millor correlaciona amb l'inici de símptomes de dolor neuropàtic. De fet, l'administració intratecal de SP facilita els reflexos espinals (Picard et al 1993, Baranaukas i Nistri 1998). El NPY es colocalitza amb GABA, regula l'alliberament de SP i sembla que té efectes inhibidors o afavoridors sobre la facilitació dels reflexos de retirada flexors

segons la dosi a la qual és administrat (Xu et al 1994). El VIP i el GAL que també solen colocalitzar-se en les mateixes projeccions tenen respectivament efectes excitadors i inhibidors sobre les respostes reflexes, de manera que l'efecte final sobre la sinapsi resulta en cada moment de la combinació dels nivells d'ambdós (Zhang et al 1995). Canvis en l'expressió d'aquests diversos neuropèptids en cooperació amb l'alliberament de glutamat són una de les bases que expliquen la facilitació sinàptica de les respostes reflexes polisinàptiques després de lesions nervioses.

#### 4.3.5.3. *Disminució de la inhibició*

Les interneurons espinals implicades en els reflexos espinals i el processament de la informació nociceptiva presenten, després de lesions una gran activitat espontània de descàrregues de llarga durada que ha estat atribuïda a la degeneració selectiva de circuits inhibidors locals (Bennet et al 1989, Laird i Benett 1993). Algunes d'aquests modificacions afecten el funcionament de circuits interlaminars locals del processament d'estimulació nociceptiva (Biella et al 1997). Interneurons aferents de les làmines I, II i III de Rexed expressen en animals normals elevats nivells de GABA i de glutamat descarboxil·lase (GAD) i s'ha suggerit que constitueixen la base dels sistemes descendents i locals de regulació de l'eficàcia sinàptica per mitjà de la inhibició presinàptica de les projeccions espinals de neurones sensorials primàries. D'aquesta manera no només el procesament sensorial, sinó també l'activitat reflexa generadora i reguladora de la locomoció a través dels circuits reflexos estaria regulada per l'acció d'aquests mecanismes (Castro-López et al 1993, 1995). L'axotomia perifèrica no reparada produeix una reducció progressiva del nombre de interneurons immunoreactives a GABA de les làmines I, II i III i una reducció del contingut de GABA a l'hemimedul·la afectada respecte de la contralateral normal. La lesió produeix de manera immediata una atrofia dels arbres dendrítics i una disminució dels contactes sinàptics d'aferents sensorials amb interneurons espinals (Hirakawa i Kawata 1992). Malgrat que la formació d'un neuroma distal acostuma a ser una font molt important d'activitat aferent, aquesta no afectaria les interneurons GABAèrgiques aïllades. També s'ha descrit en làmines I-V, una reducció de la inhibició per despolarització de l'aferent primària espinal producte de l'isolament cel·lular dels circuits descendents i locals reversible amb l'aplicació de factors neurotròfics a l'extrem lesionat (Castro-López et al 1993, 1995). Algunes de les interneurons que expressen receptors per a GABA mostra també coexpressió de receptors per glutamat i es relacionen específicament amb aferents tipus C de la làmina I i II (Popratiloff 1996). L'increment de l'expressió del receptor AMPA permeable a  $\text{Ca}^{2+}$  després de lesions perifèriques produeix un increment de l'acció del glutamat, que exerciria efectes tòxics sobre els elements postsinàptics. La degeneració selectiva d'aquestes interneurons que coexpressen GABA significa la degeneració de circuits de control local interlaminars i per tant una pèrdua d'eficàcia dels sistemes inhibidors (Sugimoto et al 1990). Diversos estudis clínics i experimentals han assenyalat els efectes de l'estimulació elèctrica espinal (Ren et al 1996, Meyerson et al 1995, Yakhnitsa et al 1999) o transcutània (Gregoric 1997) com a supressors de la facilitació i l'excitabilitat de respostes reflexes induïdes per una lesió perifèrica. Aquests treballs han demostrat que aquesta tècnica terapèutica contra el dolor neuropàtic produeix un increment del llindar d'excitabilitat (Ren et al 1996, Meyerson et al 1995) i un decrement de l'amplitud dels components

reflexes (Gregoric 1997, Yakhnitsa et al 1999) per l'estimulació de sistemes reguladors descendents i locals de l'activitat reflexa polisinàptica.

#### *4.3.5.4. Increment de l'excitabilitat sinàptica*

L'increment de l'excitabilitat sinàptica es pot produir per modificacions de les propietats biofísiques de les neurones sensorials que facilitin l'increment del potencial de repòs transmembrana i la despolarització. En l'apartat dedicat al reflex monosinàptic ja ens hem referit a algunes d'aquestes alteracions que juguen un paper important en la regulació de l'excitabilitat de tota mena de reflexos. Especialment rellevants són els canvis en l'expressió de canals de  $\text{Na}^+$  (Zhang et al 1997, Dib-Hajj SD 1998) i de  $\text{K}^+$  (Ishikawa et al 1999), que tenen lloc en tota mena de neurones sensorials i que poden explicar la facilitació sinàptica que es posen de manifest els nostres resultats. Paral·lelament als canvis en l'expressió de canals i neuropèptids de les aferents primàries, es produeixen també modificacions en l'expressió de canals lligats a receptors ionotrópics. Entre tots ells els canvis associats als receptors ionotrópics de glutamat, NMDA, AMPA i kaïnàt, han resultat especialment rellevants per explicar la sensibilització espinal després de lesions perifèriques i la facilitació de respostes reflexes en models anàlegs d'estimulació sensorials. Diversos estudis han demostrat l'acció inhibidora d'antagonistes del receptor NMDA sobre les característiques electrofisiològiques (McMahon et al 1993) i conductuals (Baños et al 1994) de la sensibilització espinal. L'entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  a través d'aquest canal regulat per  $\text{Mg}^{2+}$  és un element crític de la inducció i probablement del manteniment de la sensibilització medul·lar, a través de receptors localitzats a nivell pre i postsinàptic (King i Thomson 1995, Baranauskas i Nistri 1998). S'ha detectat una àmplia expressió de les subunitats GluR1 i GluR2/3 del receptor AMPA en elements postsinàptics de aferències amielíniques (GluR1) i mielíniques (GluR2/3) de les capes superficials de la banya medul·lar posterior (Popratiloff et al 1996). La subunitat GluR2 confereix al receptor una baixa permeabilitat al  $\text{Ca}^{2+}$ , que per contra és elevada en receptors constituïts per GluR1 o GluR3, i forma part de la població de receptors implicada en la transmissió d'informació nociceptiva a les interneurones espinals (Popratiloff et al 1996). El receptor metabotrópic del glutamat (mGluR) també ha estat implicat en fenòmens de plasticitat i modulació sinàptiques. L'activació del mGluR despolaritza les neurones espinals i potencia l'entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  a través de receptors NMDA i AMPA. La coactivació entre aquests tres tipus de receptors s'ha proposat com a model per explicar l'hiperalgèsia mecànica en models de neuropatia (King i Thomson 1995). Canvis en l'expressió de receptors ionotrópics de glutamat i en la composició de les seves unitats determinen modificacions de la permeabilitat al  $\text{Ca}^{2+}$  i produeix alteracions sobre l'excitabilitat de les vies reflexes. Després de lesions del nervi ciàtic s'incrementa l'expressió de les subunitats GluR1 i GluR2/3 del receptor AMPA en l'hemimedul·la dorsal ipsilateral (làmina II) a la lesió sense que s'observin modificacions de les subunitats de receptor NMDA (Popratiloff et al 1998).

#### *4.3.6. Efectes del grau d'innervació i l'especificitat de la reinnervació*

Les nostres dades indiquen que la sensibilització espinal que adquireix els seus nivells màxims probablement al cap de poques hores de produïda la lesió (Wall i Woolf 1984, 1986) tendeix a

atenuar-se a mesura que té lloc la reinnervació perifèrica sensorial. Els grups amb bona reinnervació mostren al final nivells d'amplitud màxima dels components facilitats (sobretot C1 i C2) més propers als preoperatoris que els grups amb nivells de reinnervació inferiors. Per analogia amb els treballs que han demostrat modificacions de l'activitat sinàptica regulada per factors tròfics procedents dels òrgans diana i transportats axonalment fins al soma neuronal (Distefano et al 1992), és probable que molècules captades per les terminals sensorials als seus nous territoris de reinnervació determinin alteracions en l'expressió de canals iònics i receptors que afectin l'activitat sinàptica central (Chew i Gallo 1999, McAllister et al 1999). Factors com el BDNF i laNT-3, però no l'NGF, tenen activitat antinociceptiva quan són injectats intracerebralment o intratecalment en rates normals que manifesten un increment del temps de retirada i un ascens del llindar d'estimulació en proves com el *tail flick* o el *hot plate* (Siuciak et al 1994). Al mateix temps, NT-3 i PDGF redueixen l'activitat de sinapsis inhibidores GABAèrgiques en neurones corticals i hipocampals actuant sobre l'expressió del receptor. Altres factors neurotròfics tenen efectes sobre l'expressió dels diferents tipus de receptors de glutamat; així bFGF produeix una disminució de l'expressió de les diferents subunitats del canal de glutamat NMDA i conjuntament amb PDGF incrementa l'expressió de la subunitat GluR1 del receptor AMPA (Chew i Gallo 1999).

Al final dels 90 dies de seguiment les nostres dades indiquen que l'amplitud dels reflexos polisinàptics es manté elevada per damunt dels nivells originals, fins i tot en grups amb una bona reinnervació, com els de compressió o secció. En comparació als nivells finals de la relació H/M, la recuperació de les respostes polisinàptiques és menor i mostren nivells d'hiperexcitabilitat més mantinguts. En aquest cas, com també pel reflex monosinàptic, la recuperació de respostes normals no depèn exclusivament de la quantitat d'innervació perifèrica sinó també de la qualitat de la reinnervació. Així, l'extensa col·lateralització perifèrica d'axons motors, sensorials i autonòmics i la manca de selectivitat regional en la reinnervació de dianes distals i espinals dels animals regenerats causa una desestructuració de la somatotopia normal d'aferents i alteracions de la concordança entre la diana perifèrica reinnervada per una cèl·lula sensorial, la xarxa d'interneurones espinals a les quals projecta i la població de motoneurones que aquestes activen com a resposta (Koerber et al 1994, Koerber et al 1995, Koerber i Mirnics 1996). Les dades del nostre grup sotmès a una sutura creuada no mostra però, nivells gaire més elevats d'excitabilitat que els altres grups subjectes a secció, fet que sembla contradir l'afirmació anterior. De fet, la reparació creuada de les branques peroneal i tibial, ambdues mixtes que condueixen a dianes motores i sensorials, és un paradigma d'inespecificitat fascicular o anatòmica en la qual els axons d'un i altre fascicle poden trobar dianes adequades des del punt de vista tissular. Per tant, les possibilitats de reinnervació tissular específica no són massa diferents entre la sutura fascicular equivocada i la correcta. Cal contemplar la capacitat del sistema nerviós per reorganitzar estructuralment o funcionalment aquest desgavell de connexions que en grups amb bona i mala reinnervació perifèrica és responsable de la manca de recuperació de la funció global.

#### 4.4. Resum final: recuperació i plasticitat de respostes reflexes espinals

Les lesions de nervis perifèrics no només afecten les funcions de control neural desenvolupades pels músculs, receptors sensorials i dianes autonòmiques sinó que alteren el funcionament de circuits reflexes monosinàptics i polisinàptics fonamentals en el control del moviment. Per la regeneració, axons sensorials adequats o aberrants reinnerven funcionalment els fusos musculars i els territoris sensorials cutanis i tornen a mediar respostes reflexes. La reinnervació perifèrica, tot i ser tissularment específica, no garantitza la concordança de la diana reinnervada amb la funció que els diferents tipus de neurones sensorials tenen assignades. A més, les lesions perifèriques severes produeixen alteracions sobre les diferents poblacions neuronals: mort de neurones sensorials petites, modificacions del patró d'expressió de canals iònics i receptors i un increment de l'excitabilitat, aïllament sinàptic i col·lateralització d'algunes aferents sobre regions espinals diferents a les originals. També la desconexió de circuits locals i descendents de control deixa de regular l'eficàcia sinàptica de circuits segmentaris. El resultat de tots aquests canvis, mediat per complexes combinacions de factors tròfics alliberats pels òrgans diana i transportats fins al soma neuronal, és l'alliberament de les respostes reflexes i una activitat incrementada davant d'estímuls habituals en grups musculars que participen de la funció global. Alguns dels canvis que ha comportat aquest estat de "facilitació" o "hiperexcitabilitat" sinàptica són dependents de la reinnervació perifèrica i involucionen quan els axons aconseguixen regenerar i reinnervar dianes com a mínim tissularment adequades. Per contra, altres arribaran a corregir les modificacions funcionals i estructurals de la connectivitat espinal. En qualsevol cas, persisteix un elevat grau d'incoherència estructural, funcional i sobretot topogràfica entre els elements aferents i eferents de les respostes reflexes, causant alteracions en la recuperació de la coordinació dels moviments i de conductes complexes com la deambulació (Wasserschaff 1990, Navarrete et al 1990). En quina mesura l'activitat és capaç d'anar seleccionant estructuralment les connexions adequades (Koerber et al 1994, 1995) o la recodificació funcional és capaç de reelaborar una somatotopia no només espinal sinó cortical coherent i compatible amb el desenvolupament de la funció (Koerber i Mirnics 1996) és un tema actual de gran controvèrsia i discussió.

