



Bases anatómicas y técnicas trazadoras fluorescentes en el estudio de la reinervación sensitiva periférica

Anna Puigdemívol Sánchez

ADVERTIMENT. La consulta d'aquesta tesi queda condicionada a l'acceptació de les següents condicions d'ús: La difusió d'aquesta tesi per mitjà del servei TDX (www.tdx.cat) i a través del Dipòsit Digital de la UB (diposit.ub.edu) ha estat autoritzada pels titulars dels drets de propietat intel·lectual únicament per a usos privats emmarcats en activitats d'investigació i docència. No s'autoritza la seva reproducció amb finalitats de lucre ni la seva difusió i posada a disposició des d'un lloc aliè al servei TDX ni al Dipòsit Digital de la UB. No s'autoritza la presentació del seu contingut en una finestra o marc aliè a TDX o al Dipòsit Digital de la UB (framing). Aquesta reserva de drets afecta tant al resum de presentació de la tesi com als seus continguts. En la utilització o cita de parts de la tesi és obligat indicar el nom de la persona autora.

ADVERTENCIA. La consulta de esta tesis queda condicionada a la aceptación de las siguientes condiciones de uso: La difusión de esta tesis por medio del servicio TDR (www.tdx.cat) y a través del Repositorio Digital de la UB (diposit.ub.edu) ha sido autorizada por los titulares de los derechos de propiedad intelectual únicamente para usos privados enmarcados en actividades de investigación y docencia. No se autoriza su reproducción con finalidades de lucro ni su difusión y puesta a disposición desde un sitio ajeno al servicio TDR o al Repositorio Digital de la UB. No se autoriza la presentación de su contenido en una ventana o marco ajeno a TDR o al Repositorio Digital de la UB (framing). Esta reserva de derechos afecta tanto al resumen de presentación de la tesis como a sus contenidos. En la utilización o cita de partes de la tesis es obligado indicar el nombre de la persona autora.

WARNING. On having consulted this thesis you're accepting the following use conditions: Spreading this thesis by the TDX (www.tdx.cat) service and by the UB Digital Repository (diposit.ub.edu) has been authorized by the titular of the intellectual property rights only for private uses placed in investigation and teaching activities. Reproduction with lucrative aims is not authorized nor its spreading and availability from a site foreign to the TDX service or to the UB Digital Repository. Introducing its content in a window or frame foreign to the TDX service or to the UB Digital Repository is not authorized (framing). Those rights affect to the presentation summary of the thesis as well as to its contents. In the using or citation of parts of the thesis it's obliged to indicate the name of the author.

Bases anatómicas y técnicas trazadoras fluorescentes en el estudio de la reinervación sensitiva periférica

Anna Puigdel·lív·ol Sánchez

Director: Alberto Prats Galino
Programa de doctorado “Organogénesis y Anatomía Clínica y Aplicada”
Departamento de Ciencias Morfológicas y Odontoestomatología
Bienio 1995 - 1997
Universidad de Barcelona

Barcelona, Septiembre 2001

Si vols saber què passa al món, obre els ulls i mira.
Albert Puigdel·lívol Vila

Sólo sé que no sé nada.
Sócrates

AGRADECIMIENTOS

Mediante estas líneas desearía mostrar mi agradecimiento a todos aquellos que han influido en que esta tesis se pudiese llevar a cabo. Así, desearía recordar en primer lugar a varios miembros del Departamento de Ciencias Morfológicas:

A los profesores Domingo Ruano Gil y Antonio Tejedo Mateu, por permitir la total accesibilidad al Departamento de Ciencias Morfológicas en que se ha llevado a cabo el trabajo.

Al Dr. Alberto Prats Galino, por su confianza, tolerancia, mentalidad abierta, agilidad en el contraste de hipótesis, por introducirme en las técnicas neuroanatómicas, por la total libertad bajo la que he podido trabajar, bajo el único compromiso de la rigurosidad y por haber sido, en definitiva, quien me ha enseñado a pensar científicamente.

Al Dr. Pau Forcada, por su abierta disposición al comentario de dudas anatómicas, por su ayuda la fotografía de disecciones y por su colaboración imprescindible en la realización de perfusiones cuando la realización del MIR dificultaba el propio desarrollo de los experimentos.

Al Dr. Manuel Llusá, por su siempre desinteresada colaboración en la realización de experimentos de regeneración.

Al Dr. Juan San, por haber estimulado a una estudiante de segundo de medicina a adentrarse en el mundo de la regeneración nerviosa, por introducirme en el Departamento y por su colaboración al mostrarme la realización de la sección-sutura del nervio ciático.

Al Dr. Pau Golanó, por la donación de material de microsutura y por su colaboración en proyectos de la línea de investigación.

Al Dr. Jesús Costa, por la donación de material de microsutura.

A varios compañeros del departamento, al Dr. Miguel Amat Roca, por sus consejos periódicos y su compañía. A la Dra. Aurora Blanco Font, por sus observaciones al inicio de mi experiencia en las técnicas neuroanatómicas. A la Dra. M^a Angels Torregrossa, por sus consejos sobre inmunocitoquímica y sobre “savoir faire”. Al Dr. Marc Canals, por el uso del sonicador y por sus aportaciones como buen vecino de laboratorio.

A los alumnos de la Facultad de Medicina Carol Mendoza, Orlando García y Isabel Fàbregues, por su colaboración en la realización de abordajes nerviosos, perfusiones y la preparación de líquidos.

A los secretarios Jordi, Olga y más recientemente a Gloria, por la resolución de numerosos aspectos administrativos.

Finalmente, un agradecimiento muy especial al personal técnico del departamento:

A Neus Cayuela, por su abierta disposición y eficacia.

A Dolors Fuster, que durante años ha sido calladamente eficiente y franca, respondiendo a las necesidades reales a lo largo del año, realizando siempre su labor con esmero.

Asimismo desearía recordar a integrantes de otras universidades por su relevante papel en la realización de esta tesis:

Al Dr. Carl Molander, de la Unidad de Neuroanatomía del Departamento de Neurociencias del Karolinska Institutet, por aceptar la aventura de colaborar a distancia en la realización de la tesis, aportando toda su experiencia, rigor, honestidad y por su

actitud en los momentos más difíciles, en que la única condición que me requirió fue el razonamiento científico.

A los Drs. Gunnar Grant y Hakan Aldskogius, del mismo Departamento, y al Dr. Peter Shortland, del Departamento de Anatomía del University College de Londres, por su disposición a la lectura crítica de algunos de los artículos que se iban a enviar.

A los Drs. Xavier Navarro y Toni Valero, del Departamento de Biología Celular, Fisiología e Inmunología de la Universidad Autónoma de Barcelona, por su disposición a la realización de proyectos conjuntos, la paciencia en las discusiones y la generosa aportación de bibliografía relevante.

Al Dr. Francesc Calafell Majó, actualmente en la Unidad de Biología Evolutiva de la Facultad de Ciencias de la Salud y de la Vida de la Universidad Pompeu Fabra, por su amistad, su disposición a escuchar, animar y por su colaboración en enseñarme lo que precisaba acerca del programa SPSS.

También desearía agradecer la colaboración puntual de varios miembros de Departamentos de la Facultad de Medicina de la Universidad de Barcelona:

Al profesor Oriol Bachs i al Dr Josep M^a Estañol de la Unidad de Biología Celular, por su desinteresada colaboración en la digitalización, impresión de imágenes y la cesión del criostato de su Departamento.

Al Dr. Lluís Jover, de la Unidad de Bioestadística, por su espontánea colaboración en resolver dudas sobre la aplicación de test sobre datos apareados en los experimentos de regeneración.

Al Dr. Ramírez, de la Unidad de Anatomía Patológica, por la amable cesión del criostato de su Servicio en el Hospital Clínico Provincial, cierta tarde desesperada en que el nuestro se averió y los del resto de la Facultad se hallaban ocupados.

Al fotógrafo de la Facultad de Medicina Magí Turmo, por su eficacia y la buena tolerancia a los apremios periódicos.

Quisiera también recordar aquí a todos aquellos que tuvieron su papel en mis inicios en investigación, previos a la realización de la tesis, integrantes de la Unidad de Bioquímica del Departamento de Ciencias Biológicas, Humanas y de la Nutrición:

A la Dra. Roser Cussó Fresquet, por concederme la primera oportunidad como investigadora, estimulándome a la presentación del primer proyecto de investigación, por promover los contactos interdisciplinarios que eran precisos para el estudio de la regeneración y animarme a continuar junto al Dr. Alberto Prats.

Al Dr. Jesús Ureña Bares, por las técnicas aprendidas junto a él, por saber escuchar en aquellos años y por sus consejos sobre las relaciones personales.

A los doctores Judit Garriga Guitart por enseñarme lo que sé sobre cultivos celulares y por la compañía de Joan Cadefau i Joan Parra.

Finalmente, un recuerdo muy especial a mi familia:

A mi padre, por inculcarme desde pequeña la actitud al “¿por qué?”

A mi madre, por su apoyo incondicional en todos los momentos difíciles.

Y naturalmente, a Josep Pich Mitjana, mi marido, por su apoyo, comprensión, paciencia, compañía y observaciones, sin el cual hubiera sido imposible afrontar este esfuerzo.

... I al petit Carles, per continuar-me rebent amb un estimulants i ampli somriure després de les forçades absències, esperant que comenci a parlar i a demanar “per què?”.

ÍNDICE

AGRADECIMIENTOS

ÍNDICE

JUSTIFICACIÓN

1. INTRODUCCIÓN	1
1.1 Lesión nerviosa periférica	1
1.2 Uso de trazadores para el estudio de la regeneración selectiva	1
2. OBJETIVOS	3
3. MATERIAL Y MÉTODOS	6
3.1 Animales experimentales	6
3.2 Anestesia	6
3.3 Trazadores	6
3.4 Procedimientos	6
3.4.1 Inyección de trazadores en dedos	
3.4.2 Aplicación de trazadores en nervios	
3.4.3 Lesiones nerviosas y suturas	
3.5 Fijación, sección del tejido y microscopía de fluorescencia	8
3.6 Identificación de las células	8
3.7 Contajes neuronales y factores de corrección	9
3.8 Reconstrucciones tridimensionales	10
3.9 Análisis estadístico	11
3.10 Diseños según los objetivos	11
3.10.1 Experimentos anatómicos	
3.10.2 Experimentos técnicos	
3.10.3 Experimentos de regeneración	
4. RESULTADOS	15
4.1 Resultados anatómicos	15
4.1.1 Descripción de la topografía en los ganglios lumbares de los principales nervios de la extremidad posterior	
4.1.2 Descripción de la topografía en los ganglios lumbares de las falanges distales de los dedos de los pies	
4.1.3 Descripción de la inervación de las falanges distales de los dedos	
4.2 Resultados técnicos	18
4.2.1 Comprobación de la eficacia en el uso combinado en nervios, comparando la aplicación de trazadores mediante inyección o cápsula	
4.2.2 Comprobación de la eficacia de su uso combinado en áreas cutáneas (falanges distales de los dedos de los pies)	
4.2.3 Comprobación de la capacidad de neuronas regenerantes para captar trazadores, comprobación de su capacidad de permanencia en los somas durante meses y de la posible alteración de la neurona tanto para regenerar como para captar otros trazadores	

4.2.4	Verificación de si el primer trazador permanece en el área de aplicación, pudiéndose captar varios meses después por axones regenerantes, marcando neuronas que no pertenecían a la población original.	
4.3	Resultados preliminares de regeneración	21
4.3.1	Cuantificación de la selectividad en la reinervación de las ramas nerviosas después de la primera bifurcación del nervio ciático	
4.3.2	Cuantificación de la selectividad en la reinervación de las falanges distales de los dedos de los pies y de la colateralización de nervios adyacentes no lesionados hacia territorios denervados	
5.	DISCUSIÓN	30
5.1	Aspectos anatómicos	30
5.1.1	Somatotopía	
5.1.2	Inervación de las falanges distales de los dedos de los pies	
5.2	Aspectos técnicos	32
5.2.1	Marcaje en ramas nerviosas	
5.2.2	Marcaje en las falanges distales de los dedos de los pies	
5.2.3	Aplicación en regeneración: “ <i>fading</i> ” del primer trazador, capacidad de neuronas regenerantes para captar trazadores, interacciones en la captación del segundo trazador	
5.2.4	Verificación de si el primer trazador permanece en el área de aplicación, pudiéndose captar varios meses después por axones regenerantes, pudiendo aparecer además en neuronas que no pertenecían a la población original	
5.3	Aspectos de regeneración	36
5.3.1	Cuantificación de la selectividad en la reinervación de las ramas nerviosas después de la primera bifurcación del nervio ciático	
5.3.2	Cuantificación de la selectividad en la reinervación de las falanges distales de los dedos de los pies y de la colateralización de nervios adyacentes no lesionados hacia territorios denervados	
5.4	Consideraciones sobre contaje neuronal	46
6.	CONCLUSIONES	48
7.	BIBLIOGRAFÍA	50
	APÉNDICE: Artículos en los que se basa la Tesis	57
	Artículo 1.- Puigdemívol-Sánchez A, Prats-Galino A, Ruano-Gil D, Molander C, (1998a), Sciatic and femoral nerve sensory neurones occupy different regions of the L4 dorsal root ganglion in the adult rat, Neuroci Lett, 251: 169-172.	
	Artículo 2.- Prats-Galino A, Puigdemívol-Sánchez A, Ruano-Gil D, Molander C, (1999), The representations of hindlimb digits in the rat dorsal root ganglia, J Comp Neurol, 408:137-145.	
	Artículo 3.- Puigdemívol-Sánchez A, Prats-Galino A, Forcada-Calvet P, Molander C, (2000a), The relative contribution of femoral and sciatic nerve branches to the sensory innervation of the hindlimb digits in the rat, Anat Rec, 260:180-188.	

- Artículo 4.- Puigdemívol-Sánchez A, Prats-Galino A, Ruano-Gil D, Molander C, (2000b), Fast Blue and Diamidino Yellow as retrograde tracers in peripheral nerves: efficacy of combined nerve injection and capsule application to transected nerves in the adult rat, *J Neurosci Methods*, 95:103-110.
- Artículo 5.- Puigdemívol-Sánchez A, Prats-Galino A, Ruano-Gil D, Molander C, (1998b), Efficacy of the fluorescent dyes Fast Blue, Fluoro-Gold and Diamidino Yellow for retrograde tracing to dorsal root ganglia after subcutaneous injection, *J Neurosci Methods*, 86:7-16.
- Artículo 6.- Puigdemívol-Sánchez A, Valero-Cabré A, Prats-Galino A, Navarro X, Molander C. On the use of fast blue, fluoro-gold and diamidino yellow for retrograde tracing after peripheral nerve injury: uptake, fading, dye interactions, and toxicity. (enviado a *J Neurosci Methods*)

JUSTIFICACIÓN

En la presente tesis se abordan las bases para un futuro estudio de la cuantificación de la selectividad en la reinervación sensitiva mediante técnicas neuroanatómicas de marcaje retrógrado con trazadores fluorescentes.

Se ha llevado a cabo una comparación entre diferentes trazadores, se ha estudiado la posible somatotopía en los ganglios lumbares de las áreas sensitivas escogidas para el estudio y se han analizado los diferentes inconvenientes de la combinación de los tres trazadores fluorescentes estudiados para la cuantificación de la regeneración.

La mayoría de estos resultados han sido ya publicados, habiéndose enviado al Journal of Neuroscience Methods el artículo que sistematiza los diferentes problemas de las combinaciones de trazadores al usarlos en un nervio lesionado, del cual se presenta su versión preliminar. La conexión temática entre las diferentes publicaciones se encuentra en el apartado Objetivos.

En la redacción del resumen de la presente tesis, se ha primado el presentar un texto sintético en todos sus apartados que sirviese de vínculo de conexión entre los diferentes artículos, en los que cada temática en particular, así como la bibliografía relevante, están desarrolladas con mayor extensión. Sin embargo, las primeras estimaciones preliminares sobre la selectividad en la reinervación de ramas nerviosas y áreas distales se han desarrollado aquí con mayor detalle que el resto de apartados por no haberse preparado todavía en el formato de artículos para su publicación.

Como se comprobará, los diferentes experimentos comparten unos métodos en común (inyecciones subcutáneas, inyecciones en nervios y aplicación de trazadores en cápsula en extremos seccionados de nervios, así como las perfusiones, procesamiento de las secciones histológicas, microscopía y reconstrucciones tridimensionales). Esos aspectos han sido agrupados en el apartado material y métodos, mientras que las diferentes secuencias metodológicas de cada diseño particular para un objetivo determinado se enumeran al final de ese apartado.

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Lesión nerviosa periférica

De lesionarse un nervio periférico, el fragmento del axón distal a la lesión degenera mientras que el proximal puede elongarse si la estructura conectiva y de células de Schwann del nervio se ha preservado. La recuperación funcional de una lesión del nervio requiere sin embargo el restablecimiento de conexiones entre las neuronas y las células diana apropiadas. Uno de los principales problemas recae en que, a pesar de que los órganos diana hayan sido reinervados por axones regenerativos, la reconexión neurona-célula diana puede ser errónea, impidiendo un adecuado control funcional de la actividad del órgano. El tipo y la localización de la lesión y la forma de reparación influyen en la calidad de la recuperación. La reinervación resulta más apropiada después de lesiones compresivas que de sección del nervio, debido a que, en el primer caso, la lámina basal de los tubos endoneurales de las fibras nerviosas permanece intacta y los axones en crecimiento son guiados a sus dianas periféricas originales (Thomas, 1989), mientras que en la sección se produce la discontinuidad de los tubos endoneurales y las cubiertas conectivas del nervio. Después de una sección nerviosa la regeneración de axones somáticos es generalmente inapropiada, excepto en animales jóvenes, resultando en disfunciones motoras y de localización sensorial (Fawcett y Keynes, 1990; Summer, 1990).

1.2 Uso de trazadores para estudios de regeneración selectiva

La tendencia de los axones a reinervar preferentemente sus destinos originales, elongándose a través de las ramas nerviosas adecuadas se ha venido demostrando a través de diferentes procedimientos que incluyen el uso de trazadores nerviosos, es decir, sustancias que, aplicadas en la zona de estudio, son interiorizadas por las terminaciones nerviosas que la inervan y transportadas hacia los somas correspondientes. Los trazadores se subdividen básicamente en enzimáticos, los cuales requieren un posterior procesamiento histoquímico, y fluorescentes, que se pueden visualizar directamente en el tejido fijado y también después de la criomicrotomía de la pieza y del correspondiente montaje sobre el portaobjetos.

Mediante el trazador enzimático peroxidasa (HRP) se ha evidenciado cuantitativamente que, al unir la rama motora proximal del nervio femoral a las ramas distales motora y sensitiva mediante una conexión de silicona “en Y”, existía un mayor número de motoneuronas regenerando hacia la rama motora (Brushart y Seiler, 1987). Sin embargo, estudios topográficos con el mismo enzima señalaron que la localización en la médula espinal (Aldskogius et al, 1987) o en el núcleo del nervio facial (Aldskogius y Thomander, 1986) de muchas de las neuronas que acababan reinervando un territorio no se correspondía completamente con la topografía previa.

Posteriormente se iniciaron estudios de doble marcaje. Así, se podía marcar la población original de neuronas que proyectaba a una determinada zona previamente a la

lesión mediante un trazador y otro trazador podía marcar otra población, la que reinervaba el área de estudio pasado el periodo de regeneración.

Para marcar distintas poblaciones neuronales, antes y después de la regeneración, se combinó inicialmente HRP con algún trazador fluorescente (Wigston y Kennedy, 1987; Brushart, 1990, 1993), pero se continuaba precisando del procesamiento histoquímico que requería el HRP. La evolución de ese modelo fue hacia el uso exclusivo de distintos trazadores fluorescentes, por sus diferentes capacidades para almacenarse en los citoplasmas o en los núcleos de las neuronas y presentar diferencias cromáticas al ser observados a través de los distintos filtros en el microscopio de fluorescencia. Algunas combinaciones de trazadores ensayadas incluyen rodamina y fluoresceína acopladas a dextran-aminas (Fritzsche y Sonntag, 1991), pero presentan el inconveniente de que sólo pueden aplicarse en nervios seccionados. También se ha usado repetidamente Flurogold (FG) con DiI (Madison et al, 1996), o FB (Popratiloff et al, 2001) pero se presenta el inconveniente de que no se pueden visualizar a través del mismo filtro (Harsh et al, 1991; Popratiloff et al, 2001).

En otros estudios se han utilizado trazadores que podían visualizarse bajo el mismo tipo de iluminación, en particular Fast Blue (FB) junto a Diamidino Yellow (DY), por presentar una fluorescencia azul y amarilla, respectivamente, al iluminarse a través del filtro ultravioleta, y concentrarse a su vez en diferentes partes de la célula, el citoplasma y el núcleo. Cuando se han realizado inyecciones intraoculares con FB y DY, valorando la reinervación simpática del ojo después de la sección y reparación del nervio carotídeo interno, se ha descrito una especificidad de hasta el 52% (Hendry et al, 1986). Inyectando uno de estos trazadores en una de las ramas del nervio ciático, el nervio sural, y el segundo en otra rama, el nervio tibialis, al cabo de dos meses de una sección+resutura del nervio ciático, se ha determinado que hasta un 9.9% de las neuronas se desvía a la nueva rama al regenerar (Molander y Aldskogius, 1992). El número de fibras desviadas puede ser incluso mayor considerando que aún existen un mayor número de ramas y que la inyección en nervios no puede garantizar que la totalidad de las fibras entren en contacto con el trazador (Taylor et al, 1983). Si bien se determinó que hasta un 30% de motoneuronas pueden reinervar el área muscular original, en este estudio no se compara el resultado con controles de re-inyección en la misma zona (Rende et al, 1991).

Por otra parte, aunque existen algunos trabajos que analizan la posible toxicidad de los trazadores (Honig y Hume, 1989; Garrett et al., 1991; St. John, 1991; Weiss y Cobbett, 1992; Onifer et al., 1993; Dong et al., 1996; Novikova et al., 1997), no se han encontrado análisis específicos de su posible efecto en neuronas regenerantes.

Asimismo, ninguna de estas combinaciones se ha utilizado de forma específica para analizar la reinervación sensitiva de los territorios más distales. Si se desea abordar su estudio, también sería preciso conocer con mayor detalle la topografía concreta de las neuronas que inervaban aquellos territorios.

2. OBJETIVOS

El objetivo general de la tesis es la búsqueda de una combinación de trazadores fluorescentes que permita cuantificar el porcentaje de regeneración, así como la selectividad en la reinervación sensitiva hacia territorios distales. Sólo cuando se establezca un método sencillo para la cuantificación de la regeneración nerviosa se podrán comparar adecuadamente las diferentes técnicas reparativas de nervios.

El modelo propuesto consiste en la aplicación de un primer trazador nervioso en el área de estudio, realizar una lesión y reparación de un nervio y, pasado el periodo de regeneración, aplicar un segundo trazador en la misma zona. La presencia de ambos trazadores en las células nos indicaría cuales de ellas han sido capaces de reinervar sus destinos originales.

Las falanges distales de los dedos de los pies presentan la ventaja de ser una de las zonas más distales y localizadas en el cuerpo de la rata, contando con unos límites naturales que reducen la difusión del trazador a zonas adyacentes y facilitan una nueva aplicación en el mismo lugar al cabo de unos meses, constituyendo un modelo experimental que permite valorar una regeneración altamente selectiva. Debe tenerse también en cuenta que, tan importante como cuantificar selectividad en la reinervación de las áreas más distales es detectar el grado de desvío que se produce desde las primeras bifurcaciones del nervio, por lo que extenderemos el estudio a la cuantificación de la regeneración en ramas nerviosas proximales.

Al escoger posibles trazadores para realizar el estudio, se decidió analizar algunas de las combinaciones que permiten observarlos simultáneamente en los somas neuronales, visualizando las preparaciones a través del mismo filtro.

De todo ello se desprende la necesidad previa de realizar un estudio anatómico de las zonas de estudio. El análisis tridimensional de la localización de las neuronas marcadas permitirá discernir la posible existencia de un patrón topográfico de las neuronas que proyectan a los dedos de los pies en los ganglios raquídeos. El estudio de la inervación anatómica constituye la base para la valoración posterior de la reinervación, para detectar posibles alteraciones en la topografía de las neuronas reinervantes respecto a la población original.

Puesto que el método se basa en la aplicación de un trazador fluorescente en un nervio o zona cutánea para marcar la población original de neuronas que a él proyecta, y en una posterior aplicación de un segundo trazador, tres meses después de la sutura, pasado el periodo de reparación, también es necesario el estudio de posibles interacciones entre los trazadores aplicados. Asimismo, es preciso verificar la posibilidad de que el primer trazador permanezca disponible en el área de aplicación para ser captado por nuevos axones regenerantes, procedentes de otras zonas y que se hayan desviado erróneamente hacia el área de estudio. En ese caso, las neuronas regenerantes aparecerían como falsamente pertenecientes a la población original, puesto que contendrían también el primer trazador. Finalmente, se trata de integrar todos estos aspectos en experimentos de regeneración.

De estas consideraciones se desprenden los objetivos concretos anatómicos, técnicos y de regeneración, que se enumeran a continuación:

Objetivos anatómicos

- Descripción de la topografía en los ganglios lumbares de:
 - Los principales nervios de la extremidad posterior (artículo 1).
 - Las falanges distales de los dedos de los pies (artículo 2).
- Descripción de la inervación de las falanges distales de los dedos (artículo 3).

Objetivos técnicos

- Comprobación de la eficacia del uso combinado de trazadores en nervios, comparando la aplicación mediante inyección y/o cápsula (artículo 4).
- Comprobación de la eficacia de su uso combinado en áreas cutáneas (artículo 5).
- Comprobación de su capacidad de permanencia en los somas durante meses, de la posible alteración de la neurona tanto para regenerar como para captar otros trazadores y de la capacidad de neuronas regenerantes para captar trazadores (artículo 6, enviado para su publicación al J Neurosci Meth).
- Verificación de la posibilidad de que el primer trazador permanezca en el área de aplicación, pudiéndose captar varios meses después por axones regenerantes, marcando neuronas que no pertenecerían a la población original (en preparación para publicación, apartados 3.10.2, 4.2.4 y 5.2.4 de la presente tesis)

- Objetivos de regeneración (en preparación para publicación, apartados 3.10.3, 4.3 y 5.3 de la presente tesis)

- Cuantificación de la selectividad en la reinervación de ramas nerviosas después de la primera bifurcación del nervio ciático.
- Cuantificación de la selectividad en la reinervación de las falanges distales de los dedos de los pies y de la colateralización desde nervios intactos adyacentes.

Los artículos que han servido de base a la presente tesis, y que se incluyen en el último apartado de la misma, corresponden a :

- Artículo 1.- Puigdellívol-Sánchez A, Prats-Galino A, Ruano-Gil D, Molander C, (1998a), Sciatic and femoral nerve sensory neurons occupy different regions of the L4 dorsal root ganglion in the adult rat, Neuroci Lett, 251: 169-172.
- Artículo 2.- Prats-Galino A, Puigdellívol-Sánchez A, Ruano-Gil D, Molander C, (1999), The representations of hindlimb digits in the rat dorsal root ganglia, J Comp Neurol, 408:137-145.
- Artículo 3.- Puigdellívol-Sánchez A, Prats-Galino A, Forcada-Calvet P, Molander C, (2000a), The relative contribution of femoral and sciatic nerve branches to the sensory innervation of the hindlimb digits in the rat, Anat Rec, 260:180-188.
- Artículo 4.- Puigdellívol-Sánchez A, Prats-Galino A, Ruano-Gil D, Molander C, (2000b), Fast Blue and Diamidino Yellow as retrograde tracers in peripheral nerves: efficacy of combined nerve injection and capsule application to transected nerves in the adult rat, J Neuroci Methods, 95:103-110.

- Artículo 5.- Puigdellívol-Sánchez A, Prats-Galino A, Ruano-Gil D, Molander C, (1998b), Efficacy of the fluorescent dyes Fast Blue, Fluoro-Gold and Diamidino Yellow for retrograde tracing to dorsal root ganglia after subcutaneous injection, *J Neurosci Methods*, 86:7-16.
- Artículo 6.- Puigdellívol-Sánchez A, Valero-Cabré A, Prats-Galino A, Navarro X, Molander C. On the use of fast blue, fluoro-gold and diamidino yellow for retrograde tracing after peripheral nerve injury: uptake, fading, dye interactions, and toxicity. (enviado a *J Neurosci Methods*)

3. Material y Métodos

3.1 Animales experimentales

Doscientas ochenta y siete ratas adultas hembras, de pesos comprendidos entre 225 y 350 gramos fueron usadas en la presente tesis. Los animales se obtenían de Harlan Interfauna Ibérica S.A., eran mantenidos en el estabulario de la Facultad de Medicina de la Universidad de Barcelona y tratados de acuerdo con los requisitos éticos del centro.

3.2 Anestesia

La anestesia se iniciaba con éter y se continuaba con inyecciones intraperitoneales de hidrato de cloral al 6% en agua destilada (300 mg./Kg.) durante los procedimientos quirúrgicos y la perfusión.

3.3 Trazadores

Se han usado los trazadores fluorescentes Fast Blue (FB, Sigma), Fluorogold (FG, Fluorochrome Inc.) y Diamidino Yellow (DY, EMS-Polyloy). Los trazadores se disolvían en agua destilada (5% FB, 10% FG y 5% DY, según los experimentos) y la mezcla se agitaba en un rotor. La disolución de FB se distribuía en diferentes viales que se conservaban durante meses en el congelador a -20° . La disolución de FG podía guardarse durante meses en la nevera. Solíamos guardar DY en polvo en la nevera y preparar la disolución correspondiente el día anterior a su uso, puesto que inmediatamente después de su preparación forma un precipitado que, dejado reposar durante un día y tras una nueva agitación, acaba formando una disolución homogénea.

3.4 Procedimientos

3.4.1 Inyección de trazadores en los dedos.

Los extremos de los dedos del pie de la extremidad posterior derecha fueron inyectados subcutáneamente con 0.5-1.5 μ l. de trazador mediante microjeringas Hamilton de 10 μ l., acopladas a agujas de 26 gauge para FB y FG, o a agujas de 25S gauge para DY. Se usaron microjeringas distintas para los diferentes trazadores. El uso de una lupa operatoria aseguraba un control óptimo de la localización del extremo de la aguja en los dedos, para inyectar el trazador en la parte central de la parte plantar del extremo distal de dedo. En unos pocos casos se produjo extravasación a través del orificio de inyección. En esos casos el trazador fue aspirado de nuevo con la jeringa y reinyectado, con la intención de obtener inyecciones de cantidades comparables entre los animales.

En los experimentos en que se realizó la inyección de un segundo trazador más adelante, se intentó realizarla en el mismo lugar, intentando cubrir un área idéntica a la

de la primera inyección. En la mayoría de los casos se podían distinguir restos del primer trazador por haber dejado éste una pequeña mancha amarillenta en la piel.

3.4.2 Aplicación de trazadores en nervios.

Cápsula.

Tras la disección y sección del nervio ciático en la parte media del muslo o del nervio tibialis en la profundidad de la fosa poplítea o del nervio femoral, inmediatamente distal al ligamento inguinal, se colocaba una pequeña torunda al fondo y se introducía el extremo proximal del nervio en una cápsula de polietileno, conteniendo 1.5 µl. de trazador, asegurándose de que éste cubría por entero el extremo seccionado del nervio. La cápsula se dejaba así durante 30 minutos. En caso de aplicarse un segundo trazador, pasados los primeros 30 minutos se retiraba la primera cápsula y se aplicaba una segunda, a la que se añadía el segundo trazador y se dejaba en contacto con el nervio por otros 30 minutos. A continuación se retiraba, se limpiaba el extremo del nervio, se retiraba la torunda y se cerraba la herida.

Inyección.

En todos los casos se realizaron inyecciones en el nervio tibialis, disecado desde un abordaje posterior, a través de la fosa poplítea. Se colocaba una pequeña torunda debajo del nervio, el cual se pinchaba unos 4 mm. distal al origen de las ramas de los músculos gastrocnemius, si bien se introducía el extremo de la aguja a través del epi-perineuro otros 3 mm. en dirección proximal y se aplicaba 1 µl. de trazador. La aguja se mantenía en esta posición unos segundos y se retiraba lentamente con la finalidad de evitar una posible extravasación del trazador.

3.4.3 Lesiones nerviosas y suturas.

Tras la exposición del nervio ciático, se procedía a su sección mediante microtijeras. Para la sucesiva sutura se utilizó monofilamento de 10-0, realizando dos puntos.

En los experimentos en que se investigaban interacciones entre trazadores se suturó el nervio ciático tras 30 minutos de exposición de su extremo distal a los trazadores. Se intentó mantener la alineación de cada fascículo con su correspondiente en el extremo distal.

En el resto de los experimentos de regeneración se procedía a preparar el primer punto con anterioridad a la realización de la sección, con tal de asegurar la alineación completa: El epi-perineuro se atravesaba en dos ocasiones en sentido próximo-distal, separadas por unos 2 mm., con la aguja del monofilamento, guardando un bucle entre los pinchazos, a través del que se introducían las microtijeras y se seccionaba el nervio. Acto seguido se tensaba el hilo, y se anudaba el primer punto. El segundo punto se realizaba en el lado opuesto.

3.5 Fijación, sección del tejido y microscopía de fluorescencia

Como norma general, los animales se perfundieron cinco días después de la aplicación final de trazador. Las ratas se reanestesiaron y se practicó una toracotomía. Tras una inyección intracardíaca de 1000 UI de heparina/kg. de peso, los animales se perfundieron a través de la aorta ascendente con 100 ml. de suero salino a temperatura ambiente, seguidos de 500-1000 ml. de paraformaldehído al 4% con sacarosa al 10% en tampón fosfato 0.1 molar y pH=7.40, durante veinte minutos. Según los experimentos se extrajeron diferentes ganglios raquídeos de los comprendidos entre L2-L6, así como los correspondientes segmentos de la médula espinal. Los niveles ganglionares se reconocieron usando la línea imaginaria entre el límite superior de las crestas ilíacas como referencia para hallar en ganglio L5. Los correspondientes segmentos de la médula espinal se encontraban entre la parte caudal del nivel vertebral L2 y la parte rostral del nivel vertebral de D11. Las piezas se postfijaban durante dos horas en la misma solución de fijación y luego se cambiaban a una solución de sacarosa al 15% en tampón fosfato, que se guardaba a 4° hasta el día siguiente. Los ganglios se cortaban al criostato a 10, 16 o 30 μm ., según se estudiaran nervios, dedos o cuando no se esperaba marcaje, respectivamente; mientras que las médulas espinales se cortaban siempre a 30 μm . Los cortes se montaban en portas gelatinizados al 5% y se montaban en una solución preservadora de la fluorescencia consistente en para-fenilen-diamina al 1% y suero salino tamponado (PBS) al 10% en glicerina.

Las secciones se observaban al microscopio de fluorescencia Olympus Vanox, a través de los filtros ultravioleta (espejo dicróico DM 400 y filtro de excitación UG1, que proporciona una excitación de 365 nm. y una longitud de onda de emisión de 420 nm.) y el filtro violeta (espejo dicróico de 455 nm. y filtro de excitación BP 405, que proporcionan longitudes de onda de 405 nm. de excitación y 455 de emisión).

Habitualmente, en los ganglios lumbares las neuronas con un núcleo visible se contaban en una de cada cinco secciones cuando se estudiaban los dedos de los pies y en una de cada diez secciones cuando se contabilizaban las aferentes de los nervios. En la médula espinal las células fueron contabilizadas en una de cada dos secciones, cuando se estudiaba el nervio femoral, y en una de cada cuatro, al estudiar el nervio ciático o sus ramas.

En cuatro casos la piel de los dedos inyectados y las partes correspondientes del pie fueron examinados mediante epifluorescencia directa para examinar la difusión del trazador en el lugar de inyección.

3.6 Identificación de las células

Las neuronas marcadas con FB muestran una intensa fluorescencia azul en el citoplasma y generalmente también en el núcleo. En cambio, el marcaje del DY podía diferir dependiendo de si el animal se perfundía a los pocos días o a los meses de su aplicación. A los pocos días, las neuronas marcadas con DY presentaban un amarillo intenso en el núcleo y menos intenso en el citoplasma, mientras que pasados unos meses aparecían unos intensos gránulos amarillos concentrados en la periferia del núcleo o bien distribuidos uniformemente por el citoplasma, con un núcleo más pálido en relación al observable con periodos cortos de supervivencia. Las neuronas marcadas con

FG presentaban un marcaje rosáceo exclusivamente en el citoplasma a través de los filtros ultravioleta y de color marrón a través del filtro violeta.

Las neuronas doble marcadas con FB y DY se identificaban mejor en el filtro violeta, debido a que en el ultravioleta el DY es menos visualizable. Ya que el FB puede también localizarse en el núcleo, en ocasiones resultaba difícil identificar las neuronas doble marcadas. En esos casos la identificación se conseguía exponiendo las secciones al filtro violeta durante medio minuto, hasta que el marcaje nuclear del FB palidecía, dejando entrever más claramente el marcaje nuclear del DY, menos intenso, pero más resistente a la luz violeta que el FB. El marcaje citoplasmático del FB era aún visible tras este procedimiento. En los casos en que el DY se había aplicado primero y el FB pasados unos meses, algunas células presentaban una coloración mixta y difusa de FB y DY, tanto en el citoplasma como en el núcleo.

Para identificar las neuronas doble marcadas con FG y DY era preciso el uso conjunto de los filtros ultravioleta y violeta. Aunque el FG no se localizase en los núcleos, el marcaje era frecuentemente tan intenso que tendía a ocultar la identificación del marcaje nuclear del DY. En esos casos la presencia de DY podía confirmarse cambiando al filtro violeta, donde el FG era menos visible, haciendo evidente al DY.

En algunos casos se sospechó difusión hematógena del trazador, al constatar que todas las células ganglionares presentaban un marcaje muy pálido de FB o FG. Sin embargo, la diferencia en la intensidad del marcaje entre esas células y las retrógradamente marcadas era considerable y no causó ningún problema de identificación. El DY no presentó en ningún caso este tipo de difusión (ver imágenes en color en artículos 3, 4 y 5).

3.7 Contajes neuronales y factores de corrección

Si bien en la mayoría de las publicaciones se presentan el total de células contadas en las secciones seleccionadas, se realizaban estimaciones del número total de células marcadas por ganglio aplicando la fórmula $(c/s)*ts$ en que c es el número contado de perfiles neuronales, s es el número de secciones seleccionadas para el contaje y ts es el número total de secciones.

Para la serie de experimentos en que se contabilizaban las neuronas que proyectaban a los dedos de los pies, se calculó un factor de corrección para núcleos fraccionados en el corte según la fórmula $n/(t+D-2b)$, donde n es el número total estimado de células previo a la corrección, t es el grosor de la sección, D el diámetro nuclear medio y b la altura del fragmento inmediatamente inferior al menor visible (Floderus, 1944). En nuestro material consideramos $2b$ como el diámetro del núcleo más pequeño medido. Después de medir 60 perfiles neuronales, el diámetro nuclear medio resultó ser de $11.05 \pm 2.32 \mu\text{m.}$, y el núcleo más pequeño medido fue de $7.24 \mu\text{m.}$ Así, el factor de corrección de Floderus se calculó en 0.80.

Un segundo factor de corrección para células fraccionadas se calculó contando el número de neuronas marcadas en cinco ganglios raquídeos obtenidos al azar de cinco animales diferentes. Los perfiles, contornos y marcas de todas las secciones, una vez fotografiadas, fueron copiados en papel vegetal (resultando una media de 47.2 secciones por ganglio). Los dibujos fueron superpuestos para verificar qué neuronas habían sido fraccionadas durante el corte y aparecían en secciones consecutivas. Cada una de ellas fue contada sólo en una de las secciones en que aparecía. El verdadero número de neuronas así

obtenido fue dividido por el número total observado, resultando en un factor de corrección empírico de 0.72.

3.8 Reconstrucciones tridimensionales

Se realizaron reconstrucciones tridimensionales del ganglio L4 para demostrar la organización relativa de las aferentes de los nervio ciático y femoral en ese ganglio y también se realizaron reconstrucciones de los ganglios L3-L5 para demostrar la distribución intraganglionar de los perfiles neuronales que recogían la información sensitiva de los dedos. Aquellos ganglios que presentaban el tejido ganglionar dispuesto en relativamente pocos islotes fueron preseleccionados para la reconstrucción. De ellos, se acabaron escogiendo aquellos cuyos contajes neuronales se aproximaban al máximo a la media para un determinado dedo (R79 para el dedo 1 y 4, R38 para el dedo 2, R84 para el dedo 3 y R49 para el dedo 5). Además, el ganglio L5 fue reconstruido en todos los animales que recibieron inyecciones simultáneas en los dedos 4 y 5.

Mediante un microscopio óptico Olympus BH2 con un brazo de dibujo acoplado, se examinó al campo oscuro una de cada dos secciones seriadas consecutivas a través de un objetivo x4. Sus contornos y detalles principales (vasos sanguíneos, fragmentos de raíz dentro del ganglio y artefactos) fueron delineados en papel vegetal a un aumento final de x44. Usando esos detalles como referencias, las secciones fueron examinadas de nuevo en el microscopio de fluorescencia y las posiciones de los perfiles neuronales fueron posicionadas dentro de los contornos de las secciones dibujadas previamente. La posible reducción del número de perfiles neuronales por la potencial desaparición del marcaje durante la exposición a la luz en el microscopio óptico se descartó contando el número de perfiles neuronales antes y después de la realización de los dibujos.

El proceso informático para la obtención de modelos 3D consiste en tres pasos: 1- digitalización de las posiciones de las células marcadas y de los contornos ganglionares mediante una tabla digitalizadora (Digicad) conectada a un sistema de análisis de imagen (IMCO 10, Kontron); 2- reconstrucción tridimensional a partir de las secciones convenientemente alineadas, mediante triangularización, a través de un software desarrollado previamente en nuestra unidad (Prats-Galino et al., 1988); 3- generación de un modelo sombreado tridimensional a partir de las facetas triangulares usando el software 3D Studio Max 1.2 (Kinetix). Los ficheros de datos originales fueron transformados al formato VRML y luego convertidos mediante el programa Crossroad File Format Converter al formato Autocad DXF, importable desde 3D Studio Max. La opacidad de la superficie ganglionar fue disminuida en un 30% para permitir la visualización de las esferas que representaban la posición de las neuronas en el interior. El modelo fue reconstruido en visión dorsal y tiene una resolución final aproximada en el plano Z de 30 μm . y de 90 a 100 μm . en los planos X e Y. Los archivos gráficos en formato TIF, con visiones dorsales del ganglio, fueron finalmente importados y montados en PowerPoint 97 e impresos usando una impresora de sublimación Kodak Digital Science 8650 PS.

Para visualizar simultáneamente las neuronas que proyectan a diferentes dedos en un único ganglio modelo para cada nivel (L3-L5), se calculó la longitud y anchura medias de los ganglios reconstruidos. Esos valores fueron usados para recalculas las coordenadas de las posiciones neuronales del interior y unificar así los diferentes ganglios. Finalmente, las nuevas coordenadas de cada población neuronal fueron incluidas en el modelo ganglionar correspondiente y renderizadas con 3D Studio Max para generar la imagen integrada final (artículo 2).

3.9 Análisis estadístico

Los totales de perfiles marcados eran comparados entre los distintos grupos mediante un test ANOVA tras verificar la normalidad de la variable mediante un test de Kolmogoroff-Smirnov. Si se detectaban diferencias entre las varianzas mediante el test de Levene, se pasaba a usar un test de Kruskal-Wallis para la comparación. Si se detectaban diferencias entre los grupos, se usaban t de Student para buscar las diferencias entre los diferentes pares de grupos de la comparación o bien se usaba el test U de Mann-Whitney en los pocos casos en que se detectaron diferencias entre varianzas. Se usó el test W de Wilcoxon para comparar los porcentajes medios entre ganglios y médula espinal en un mismo experimento y test de Kruskal-Wallis para comparar porcentajes entre grupos. Si se detectaban diferencias significativas, se pasaba a usar el test U de Mann-Whitney para comparar los porcentajes medios entre diferentes pares grupos comparados.

Cuando se compararon amplitudes de potenciales y latencias en los experimentos de electrofisiología se usaron los test de Kruskal-Wallis y la U de Mann-Whitney.

3.10 Diseños experimentales según los objetivos

En los siguientes apartados, cada paso numerado indica las intervenciones que se realizaron en un día concreto.

3.10.1 Experimentos anatómicos.

Descripción de la topografía en los ganglios lumbares de los principales nervios de la extremidad posterior (n=3).

1. Disección y sección de los nervios femoral y ciático. Aplicación de una cápsula de FB en el extremo proximal del nervio ciático y de FG o de DY en el extremo proximal del nervio femoral.
2. Perfusión a los cinco días de la última aplicación de trazador.

Descripción de la topografía en los ganglios lumbares de las neuronas que inervan las falanges distales de los dedos de los pies.

Serie 1.

1. Inyección en los extremos de los dedos de los pies con 0.5 µl. de FB, FG o DY (n=5, por cada dedo).
2. En algunos casos -ver artículo2- inyección a los 10 días de 1.5 µl. de DY en los que previamente habían recibido FB o FG.
3. Perfusión a los cinco días de la última aplicación de trazador.

Serie 2.

1. Inyección de FG en el dedo 4 y de FB en el dedo 5 (n=6).
2. Perfusión a los cinco días.

Descripción de la inervación de las falanges distales de los dedos.

Determinación de los nervios que participan en la inervación de los dedos.

1. Sección de los nervios ciático, femoral, cutáneo posterior o musculocutáneo (n=17), (ver nervios seccionados en cada caso, así como definición y trayecto del nervio en artículo 4)
2. A continuación, inyección de los extremos de los dedos de los pies con 0.5 µl. de FB, FG o DY (ver tabla correspondiente en artículo 4)
3. Perfusión a los cinco días de la aplicación de trazador.

Cuantificación de la participación de los diferentes nervios en la inervación de los dedos.

- Nervio femoral:

1. Inyección de 0.5 µl. de FB en el dedo 1 y de FG en el dedo 2 (n=6).
2. A los cinco días de la inyección, disección y sección del nervio femoral y aplicación de DY en su extremo proximal.
3. Perfusión cinco días más tarde.

- Nervio musculocutáneo:

1. Inyección de 0.5 µl. de FB en los dedos 1 y 2 y de FG en los dedos 3, 4 y 5 (n=6).
2. A los cinco días de la inyección, disección y sección del nervio musculocutáneo y aplicación de DY en su extremo proximal.
3. Perfusión cinco días más tarde.

3.10.2 Experimentos técnicos.

Comprobación de la eficacia de su uso combinado en nervios, comparando la aplicación de trazador mediante inyección o cápsula.

Aplicaciones en cápsula.

1. Disección y sección del nervio ciático, aplicación de DY en una cápsula localizada en su extremo proximal y a continuación aplicación de FB en el mismo lugar (n=5).
2. Perfusión cinco días más tarde.

Comparación de la inyección con la aplicación inmediata de una cápsula.

1. Disección del nervio tibialis. Inyección de FB (n=5) o DY (n=5). Sección del nervio tibialis inmediatamente distal al punto de inyección. Aplicación de una cápsula de DY en los que se había inyectado FB y viceversa.
2. Perfusión a los 5 días.

Comparación de la inyección con la aplicación de una cápsula al cabo de meses.

1. Disección del nervio tibialis. Inyección de FB o DY.
2. Pasados de 1 a 2 meses, sección del nervio tibialis inmediatamente proximal al punto de inyección. Aplicación de una cápsula de DY en los que se había inyectado FB (n=10) y viceversa (n=9).
3. Perfusión a los 5 días.

Comprobación de la eficacia de su uso combinado en áreas cutáneas.

1. Inyección de 0.5 μ l. FB o FG en las falanges distales de los dedos.
2. A los 10 días, aplicación de 0.5 μ l. y 1.5 μ l. de DY en los previamente marcados con FB (n=7 y n=5, respectivamente) y de las mismas cantidades de DY en los previamente marcados con FG (n=6 y n=6, respectivamente). En otros animales previamente inyectados con FB (n=6) o FG (n=6) no se realizó reinyección con DY.
3. Perfusión a los 5 días de la última aplicación de trazador.

Comprobación de la capacidad de permanencia de los trazadores en los somas durante meses, de la posible alteración de la neurona tanto para regenerar como para captar otros trazadores y comprobación de la capacidad de neuronas regenerantes para captar trazadores. Comprobación de la afectación del nervio por inyecciones.

1. Disección y sección bilateral del nervio ciático. Aplicación de FB (n=8), FG (n=8) o DY (n=7) en una cápsula colocado en el extremo proximal del nervio ciático derecho y de una cápsula con suero salino en el extremo proximal del nervio ciático izquierdo. Sutura de los nervios con nylon de 10-0 (n=8 en cada grupo). En un último grupo, sin lesionar el nervio ciático, disección del nervio tibial derecho e inyección de 1 μ l. de suero salino (n=8).
2. A los tres meses, evaluación electrofisiológica (Dr. A. Valero, UAB) y, en los grupos de aplicación de trazadores, nueva disección bilateral del nervio ciático, con sección bilateral 0.75 cm. distal a la sutura. En el lado derecho, aplicación de una cápsula con DY en los nervios ciáticos que habían recibido FB o FG y aplicación de FB en el nervio ciático que había sido marcado con DY. En el lado izquierdo, aplicación de una cápsula con FB en un grupo, con FG en otro y con DY en el tercer grupo.
3. Perfusión a los 5 días.

Verificación de la posibilidad de que el primer trazador permanezca en el área de aplicación, pudiéndose captar varios meses después por axones regenerantes, marcando neuronas que no pertenecían a la población original.

1. Sección+sutura del nervio ciático + resección del nervio musculocutáneo (en los casos de aplicación del trazador en áreas distales).
2. A los 3 días, inyección de FB, FG o DY en el nervio tibial (n=6, n=6 y n=8, respectivamente) o en las falanges distales de los dedos 4 o 5 de los pies (n=5, n=4 y n=5, para FB, FG y DY, respectivamente). En otros animales control se aplicó trazador en el nervio tibialis de un lado y en los dedos del otro (n=1, FB; n=1, FG; n=1, DY).
3. Perfusión a los dos meses en caso de inyección nerviosa o a los tres meses en caso de inyección en los dedos. Los controles se perfundieron a los cinco días de la aplicación de trazador.

3.10.3 Experimentos de regeneración.

Cuantificación de la selectividad en la reinervación de ramas nerviosas de la primera bifurcación del nervio ciático (n=6).

1. Disección bilateral del nervio tibial. Inyección de 1 µl. de DY.
2. A los cinco días, sección+sutura del nervio ciático derecho.
3. A los dos meses, disección bilateral del nervio tibialis, sección inmediatamente proximal al punto de inyección y aplicación de una cápsula con FB.
4. Perfusión a los cinco días.

Cuantificación de la selectividad en la reinervación de las falanges distales de los dedos de los pies y de la colateralización de nervios adyacentes no lesionados hacia territorios denervados (n=6).

1. Inyección bilateral de 0.5 µl. de DY en el dedo 3.
2. A los cinco días, sección+sutura del nervio ciático derecho.
3. A los tres meses, inyección de 1.5 µl. de FB en los mismos dedos.
4. A los cuatro días, disección y sección bilateral de los nervios femoral y musculocutáneo. Aplicación de una cápsula conteniendo FG en sus extremos proximales.
5. A los cuatro días, perfusión del animal.

Experimento para explicar el alto porcentaje de neuronas doble marcadas en L5 respecto al resto de ganglios –ver resultados de regeneración en falanges distales- (otras fuentes de inervación intactas vs. mayor selectividad de las neuronas de ese ganglio para reinervar los dedos) (n=3).

1. Sección+sutura del nervio ciático derecho.
2. A los tres meses, resección bilateral del nervio ciático + inyección bilateral de 1.5 µl. de FB en el dedo 3.
3. A los cinco días, resección bilateral de los nervios femoral y musculocutáneo + inyección bilateral de 1.5 µl. de FG en el dedo 3 y de 0.5 µl. en los restantes dedos.
4. A los cinco días, perfusión del animal.

4. RESULTADOS

4.1 Resultados anatómicos

4.1.1 Descripción de la topografía en los ganglios lumbares de los principales nervios de la extremidad posterior. Artículo 1.

Las neuronas sensitivas retrógradamente marcadas del nervio ciático se encontraron en los ganglios raquídeos L4-6, mientras que las del nervio femoral se hallaron en los ganglios L2-4. Excepto en L4, no se observaba ninguna distribución topográfica particular de esos nervios en las diferentes secciones de los ganglios. Sin embargo, en L4, la mayoría de neuronas pertenecientes al nervio femoral se encontraban en la parte más dorsal y rostral, mientras que al progresar ventralmente el número de neuronas del nervio femoral se reducía gradualmente, hasta quedar restringidas a una fina banda lateral en la parte más anterior. Las neuronas del nervio ciático ocupaban en cambio el resto del ganglio, situándose principalmente en una posición medial y ventral, siendo más numerosas que las neuronas del nervio femoral. Ambas poblaciones se encontraban claramente separadas, con un escaso solapamiento condicionado por la presencia de unas pocas neuronas en la zona limítrofe. Esta distribución fue claramente demostrada en las reconstrucciones tridimensionales.

4.1.2 Descripción de la topografía en los ganglios lumbares de las falanges distales de los dedos de los pies. Artículo 2.

Contajes neuronales.

Observaciones en cinco casos demostraron que en los ganglios L2 y L6 se identificaban menos de cinco perfiles neuronales después de inyecciones en los dedos 1 y 5, respectivamente. Por tanto, esos ganglios se excluyeron del análisis detallado de las representaciones de los dedos en los ganglios. Además, tampoco se encontraron neuronas pertenecientes a los dedos 4 y 5 en L3, así que aquel ganglio sólo se detallan los contajes de los dedos 1, 2 y 3.

El número total inferido de perfiles marcados para un dedo en particular variaba considerablemente entre animales, presentando, en los casos más extremos (dedo 3), rangos de 154.3 a 780.2. Sin embargo, las medias de perfiles neuronales de los diferentes dedos eran similares (entre 410.1 y 472.4), sin diferencias significativas al comparar las medias ($p=0.98$). También existía una variación muy importante en el número de perfiles neuronales correspondientes a un dedo concreto en un determinado nivel ganglionar.

La representación de los dedos en los ganglios variaba según el nivel. En general, el ganglio L3 contenía neuronas de los dedos 1 y 2, mientras que el ganglio L5 contenía más neuronas de los dedos 4 y 5. En el ganglio L4 estaban representados todos los dedos, siendo mayoritarias las neuronas del dedo 3.

Distribución tridimensional.

El examen de las representaciones tridimensionales de los diferentes dedos en los ganglios raquídeos revelaban una distribución difusa, con poca tendencia a formar agregados. Algunos dedos no se hallaban representados en algunas zonas de determinados ganglios. Así, en los ganglios reconstruidos, las neuronas ganglionares del dedo 1 tendían a distribuirse principalmente en la parte caudal de L3 y la rostral de L5, el dedo 2 no aparecía representado en las partes más rostrales de L4, los dedos 3 y 4 aparecían representados principalmente en la parte rostral de L5 y la inervación del dedo 5 procedía de la parte central de L4 y L5. Sin embargo, al observar la superposición de las diferentes posiciones neuronales de los diferentes dedos en un modelo ganglionar único, las diferentes poblaciones se encontraban mezcladas, especialmente en L4. Solamente parecía observarse cierta organización en L5, en que el dedo 4 parecía quedar representado rostralmente al dedo 5. Esta distribución en particular fue sucesivamente identificada en 4 de 6 animales en que se repitieron las inyecciones combinadas de estos dedos. Tanto R136, 138, 139 y 162 mostraron esta organización, si bien en R137 y R140 las neuronas se encontraron más mezcladas.

4.1.3 Descripción de la inervación de las falanges distales de los dedos. Artículo 3.

Determinación de los nervios que participan en la inervación de los dedos.

Después de la resección del nervio ciático y la inyección en los dedos 1-5, se podían identificar perfiles neuronales en los ganglios L3-5. Tras la inyección de un trazador en los dedos 1 y 2 y de otro distinto en los dedos 3-5, junto con la resección del nervio ciático, se observaban perfiles neuronales en L3-4 procedentes de los dedos 1 y 2, pero no del resto de dedos. Tanto el ganglio L5 como L6 contenían unas pocas neuronas marcadas procedentes de todos los dedos. Cuando se añadió la resección del nervio femoral a la del ciático, los perfiles los dedos eran visibles en L5 (de 7 a 45 perfiles) y en L6 (hasta 22 perfiles), desapareciendo el marcaje en los ganglios L3 y L4. Añadiendo la resección del nervio cutáneo posterior del muslo se observaba un número similar de neuronas en L5 y unas pocas en L6.

Aquellos animales que recibieron una resección del nervio ciático a la altura del muslo y de una rama proximal, que hemos denominado nervio musculocutáneo, apenas mostraban marcaje en L5-L6 (de 1 a 3 perfiles, exceptuando un caso en que se apreciaron 7 en L6).

Con la resección de todos los nervios mencionados, ciático, femoral, musculocutáneo y cutáneo posterior del muslo, aparecían de 1 a 2 perfiles neuronales en L5 o L6. En un caso, no apareció ninguna neurona en ningún ganglio.

Cuantificación de la participación de los diferentes nervios en la inervación de los dedos.

Nervio femoral

Después de la aplicación de FB en el dedo 1 y de FB en el dedo 2, combinada con la aplicación de DY en el nervio femoral, se identificó marcaje de FB y FG en L3-L6 y de DY en L2-L4, con una considerable variación interindividual.

En L3 el DY se encontraba presente en el 89% de las neuronas marcadas con FB y en el 90.8% de las marcadas con FG, mientras que en L4 estaba en el 12% de las FB positivas y en el 9.8% de las que contenían FG.

Nervio musculocutáneo

Después de la inyección de FB en los dedos 1 y 2, de FG en los dedos 3-5 y de la aplicación de DY en el nervio musculocutáneo, podía apreciarse marcaje de FB en los ganglios L3-L6, de FG en L4-L6 y de DY en L4-L6. El DY se distribuía principalmente en L5, con menos neuronas en L6 y L4.

Las neuronas doble marcadas con los trazadores aplicados en los pies y en el nervio musculocutáneo (FBDY o FGDY) se encontraron en L5 y L6. En L5, el 2.4% de los perfiles marcados con FB y el 5.5% de los marcados con FG contenían también DY, mientras que en L6 el DY se encontraba en el 9.2% de los perfiles con FB y en el 20.5% de aquellos con FG.

El examen de la médula espinal reveló la presencia de motoneuronas marcadas con DY.

Trayecto del ramo musculocutáneo del nervio ciático en relación al resto de nervios del muslo.

Inmediatamente caudal al músculo glúteo medio, el nervio cutáneo posterior del muslo abandona el trayecto adyacente al nervio ciático. El nervio cutáneo posterior continúa caudalmente, lateral al músculo caudofemoral y medial a la cabeza accesoria del músculo semitendinoso. Después de abandonar la vecindad de estos músculos discurre subcutáneamente hacia la fosa poplítea.

Distalmente a la separación del nervio cutáneo posterior del nervio ciático, un pequeño ramo abandona, a pocos milímetros, el tronco ciático, ramo que hemos denominado musculocutáneo. Al principio adopta una dirección caudal para luego dirigirse internamente hacia la fosa poplítea. Pasa medial al músculo caudofemoral, donde se subdivide en múltiples ramitos, la mayoría dirigidos al borde medial del músculo bíceps crural. El primero de los ramitos se dirige directamente a la parte medial del músculo, mientras que los dos siguientes se subdividen antes de incorporarse al vientre muscular. El cuarto ramito continúa distalmente hacia la fosa poplítea donde se divide. Una de las terminales penetra en la profundidad del vientre del músculo semimembranoso mientras otra terminal entra en el tejido adiposo de la fosa poplítea. En dos de los cinco casos examinados se pudo discernir una última ramita que, una vez subcutánea, cruzaba el nervio cutáneo posterior y parecía terminar en la piel medial de la rodilla. En otros dos casos, la rama terminal parecía anastomosarse al nervio cutáneo posterior. En el espesor del tejido adiposo de la fosa poplítea estos terminales parecían alcanzar vasos venosos que más distalmente se concretaban en las venas safenas parvas. No fue posible seguir esos ramos más distalmente.

Distal a la emergencia del ramo musculocutáneo, el nervio ciático se dirige a la rodilla entre el músculo bíceps crural y el fémur. En el tercio medio del muslo el nervio sural lateral abandona el nervio ciático y se dirige lateralmente a la parte media del músculo bíceps, al cual atraviesa para ir a inervar la piel lateral y posterior de la rodilla. Finalmente el nervio ciático se divide en los nervios tibial, peroneal y sural.

4.2 Resultados técnicos

4.2.1 Comprobación de la eficacia de su uso combinado en nervios, comparando la aplicación de trazador mediante inyección o cápsula. Artículo 4.

Aplicación en cápsula.

La aplicación de una cápsula con DY en el extremo proximal del nervio ciático seccionado, seguida de una segunda cápsula con FB consigue el doble marcaje del 96.6% de neuronas ganglionares y del 96.7% de motoneuronas en la médula espinal. No existían diferencias significativas entre los porcentajes de doble marcaje entre motoneuronas y células ganglionares ($p=0.69$).

Inyección nerviosa inmediatamente seguida de aplicación en cápsula.

La inyección de DY en el nervio tibial, seguida inmediatamente de la sección del nervio y de la aplicación de una cápsula con FB resultó en el doble marcaje del 97.3% de las células ganglionares y del 93.7% de las motoneuronas que también habían sido marcadas con DY. No existían diferencias significativas entre los porcentajes de doble marcaje entre motoneuronas y células ganglionares ($p=0.07$).

El proceso inverso, en cambio, es decir la inyección de FB seguida de la aplicación de una cápsula con DY, conseguía un doble marcaje del 10.6% de las células que contenían FB en los ganglios raquídeos y del 13.3% de las motoneuronas con FB. No existían diferencias significativas entre los porcentajes de doble marcaje entre motoneuronas y células ganglionares ($p=0.69$).

Las diferencias en los porcentajes de doble marcaje entre las diferencias secuencias de aplicación de los trazadores fueron significativamente distintas, tanto en los ganglios raquídeos como en motoneuronas ($p<0.01$).

Inyección de trazador seguida meses más tarde de una aplicación en cápsula.

La inyección de DY en el nervio tibial, seguida dos meses más tarde por una sección y aplicación de una cápsula con FB, resultó en un doble marcaje del 92.3% de todas las células que previamente habían captado el DY en los ganglios lumbares y del 86.9% en las motoneuronas. La diferencia entre los porcentajes en células ganglionares y motoneuronas fue estadísticamente significativa ($p=0.01$). No hubo diferencias significativas en el número total de células con DY al comparar estos contajes con los obtenidos a en periodos de supervivencia de cinco días en ganglios ($p=0.99$) o en la médula espinal ($p=0.13$).

El procedimiento inverso, la inyección de FB seguida de una cápsula de DY después de uno o dos meses, resultó en un doble marcaje del 73.2% de todas las células que presentaban FB en los ganglios y del 59.5% de las motoneuronas con FB. Los contajes procedentes de ratas que sobrevivieron uno o dos meses, desde la inyección hasta la aplicación de la cápsula, se presentan conjuntamente, al no aparecer diferencias entre ellos, respecto al número de dobles marcadas (células ganglionares, $p=0.67$; motoneuronas, $p=0.83$) ni en el número total de neuronas con FB (células ganglionares, $p=0.39$; motoneuronas, $p=0.67$). Estos resultados, obtenidos tras la aplicación retardada de la cápsula con DY, son significativamente distintos a los obtenidos tras la aplicación

inmediata, tanto en los ganglios raquídeos ($p=0.001$) como en las motoneuronas de la médula espinal ($p=0.003$). No hubo diferencias significativas en cuanto al número total de células que presentaban FB a los cinco días o a los meses de su aplicación en células ganglionares ($p=0.43$) o motoneuronas ($p=0.71$).

4.2.2 Comprobación de la eficacia de su uso combinado en áreas cutáneas (falanges distales de los dedos de los pies). Artículo 5.

El examen de la piel y del tejido subcutáneo reveló que la distribución de los trazadores se restringía al dedo en que habían sido inyectados, estando principalmente localizados en las áreas más distales.

Se encontró un número muy variable de neuronas que inervaban los pies en los ganglios L3-L5, no existiendo diferencias significativas entre el número de células marcadas con FB o FG ($p=0.58$) cuando éstos trazadores se inyectaron en dos grupos en el dedo 2.

Cuando la inyección de 0.5 μ l. de FB o FG fue seguida a los diez días de la inyección de la misma cantidad de DY, no hubo diferencias significativas respecto al número de células marcadas con los dos trazadores en ambos grupos ($p=0.64$ y $p=0.66$).

En el grupo en que se aplicó primero FB, un 75% de las neuronas que presentaban este trazador también aparecían marcadas con DY al inyectar la misma cantidad. Este porcentaje se incrementaba al 82% si se aumentaba la cantidad de DY inyectado a 1.5 μ l., si bien esta diferencia no fue estadísticamente significativa ($p=0.68$).

En el grupo en que se aplicó primero FG, un 74% de las neuronas que fueron inicialmente marcadas con este trazador captaron también DY, porcentaje que se incrementó al 84% al aumentar la cantidad de DY, aunque la diferencia no fue estadísticamente significativa ($p=0.26$).

4.2.3 Comprobación de la capacidad de neuronas regenerantes para captar trazadores, comprobación de su capacidad de permanencia en los somas durante meses y de la posible alteración de la neurona tanto para regenerar como para captar otros trazadores. Artículo 6.

Resultados morfológicos.

Cuando se aplicaba para marcar células regenerantes, el DY tendía a marcar menos neuronas que FB y FG, tanto en células ganglionares como en motoneuronas. Este efecto se observaba ya cuando se aplicaba solo y aumentaba al aplicarse tras un marcaje previo de FB o FG, hasta hacerse significativo en motoneuronas ($p<0.05$). La permanencia de los tres trazadores fue análoga en los ganglios lumbares pero el FG desaparecía más que el resto en las motoneuronas ($p=0.008$). Al marcar regenerantes, el FB marcaba un número similar de neuronas en los ganglios ($p=0.64$) y en la médula espinal ($p=0.61$), tanto cuando se usaba solo como si se utilizaba de segundo trazador. En la mayoría de grupos, el total de células marcadas estaba disminuido en un 30% respecto a un nervio control perfundido a los 5 días de marcaje, tanto en los ganglios raquídeos como en la médula espinal.

Electrofisiología.

Los resultados electrofisiológicos no detectaron diferencias constantes entre los diferentes grupos experimentales, siendo todos ellos significativamente distintos al control no lesionado. No hubo diferencias entre el grupo de inyección de salino en el nervio y el grupo control.

4.2.4 Verificación de si el primer trazador permanece en el área de aplicación, pudiéndose captar varios meses después por axones regenerantes, marcando neuronas que no pertenecían a la población original. En preparación para publicación.

Cuando los trazadores FB, FG o DY se aplicaron en el nervio tibial dos días después de una sección+sutura del nervio ciático y las ratas se perfundieron a los dos meses, se observaron somas marcadas (Tabla 1), tanto en los ganglios lumbares (346.2 ± 252.1 , 89.6 ± 124.8 y 168.4 ± 231.2 para FB, FG y DY, respectivamente –diferencias no significativas, $p=0.13$ -), como en la médula espinal (132.0 ± 114.3 , 8.5 ± 19.86 y 35.3 ± 67.3 , respectivamente -significativamente diferentes, $p=0.01$ -), existiendo una gran variabilidad entre los animales. Los datos presentados en la Tabla 1 corresponden a los contajes en una de cada 10 secciones ganglionares y una de cada 4 en la médula espinal. En los controles perfundidos a los cinco días de la aplicación de trazador, tres días después de la sutura, solamente aparecieron 78 neuronas en el caso marcado con FB.

TABLA 1. **Recaptación en los nervios.** Número de células marcadas en una de cada diez secciones de los ganglios raquídeos L4-L5 y en una de cada cuatro en la médula espinal.

FB			FG			DY		
	Ganglios	Médula espinal		Ganglios	Médula espinal		Ganglios	Médula espinal
R275 D	429	118	R277 D	12	0	R225 D	19	1
R275 I	195	26	R277 I	230	2	R226 D	297	20
R274 D	4	4	R278 D	6	0	R227 D	15	2
R274 I	663	309	R278 I	6	0	R258 D	115	27
R276 D	211	125	R279 D	14	0	R259 D	29	7
R276 I	575	210	R279 I	270	49	R260 D	143	20
						R270 D	39	5
						R271 D	690	200
Media	346.2	132.0		89.7	8.5		168.4	35.3
SD	252.1	114.3		124.9	19.9		231.2	67.3

Cuando los mismos trazadores se aplicaron en las falanges distales de los dedos de los pies, también se observaron somas marcadas (Tabla 2) en los ganglios lumbares tras inyecciones de FB y DY (32.0 ± 16.8 y 2.2 ± 3.3 , respectivamente, -significativamente diferentes, $p=0.009$ -) pero no tras la inyección de FG. Los datos presentados en la tabla corresponden a los totales neuronales en todos los cortes. En los controles perfundidos a los cinco días de la aplicación de trazador no aparecieron neuronas marcadas.

TABLA 2. **Recaptación en los dedos.** Número total de neuronas marcadas obtenido tras observar todos los cortes y contando cada neurona en una sola de las secciones ganglionares de L3 a L6 en que aparecía.

Caso	FB	FG	DY
R220 D	10	R220 I 0	R222 I 2
R221 D	20	R221 I 0	R223 D 1
R222 D	45	R222 I 0	R223 I 0
R223 D	50	R223 I 0	R224 D 8
R224 D	35		R224 I 0
Media	32.0	0	2.2
SD	16.8	0	3.3

4.3 Resultados preliminares de regeneración.

En preparación para publicación.

4.3.1 Cuantificación de la selectividad en la reinervación de ramas nerviosas después de la primera bifurcación del nervio ciático.

Los resultados comentados en los diferentes apartados de este capítulo se refieren a las tablas siguientes.

TABLA 3. **Neuronas contadas en el experimento de reinervación de ramas nerviosas.** Neuronas marcadas contadas en una de cada diez secciones en los ganglios lumbares L4-L5 y en una de cada cuatro en la médula espinal.

Ganglios	Exp			Ctrol		
	FB	DY	FBDY	FB	DY	FBDY
R250	276	61	458	52	63	594
R251	147	11	533	57	77	680
R253	291	40	487	63	69	646
R254	162	57	654	58	77	998
R255	55	139	824	101	24	894
R257	87	107	1002	252	155	972
Media	169.7	69.2	659.7	97.2	77.5	797.3
SD	96.5	46.4	214.8	77.9	42.8	177.8
Médula espinal	Exp			Ctrol		
	FB	DY	FBDY	FB	DY	FBDY
R250	127	27	86	25	46	145
R251	25	14	152	3	40	205
R253	153	22	133	41	37	235
R254	32	11	127	1	44	240
R255	34	14	188	0	76	255
R257	23	21	127	7	69	154
Media	65.7	18.2	135.5	12.8	52.0	205.7
SD	58.3	6.1	33.6	16.6	16.3	46.5

TABLA 4. Índices de reinervación, de inervación perdida, de regeneración selectiva y de “fading” en la reinervación de ramas nerviosas. Obtenidos tras operar con las cifras de la Tabla 3, según las fórmulas descritas en cada apartado del capítulo 4.3.1.

Ganglios	Reinervación						“Fading”	
	IR _{min}	IR _{max}	IP _r	IP _g	RS _r	RS _g	Fd _{min}	Fd _{max}
R250	103%	113%	12%	9%	88%	77%	24%	30%
R251	83%	92%	2%	1%	98%	78%	14%	22%
R253	100%	109%	8%	6%	92%	75%	26%	33%
R254	72%	77%	8%	5%	92%	66%	8%	14%
R255	86%	88%	14%	15%	85%	92%	-22%	-19%
R257	79%	89%	10%	9%	90%	103%	-25%	-11%
Media	87.4%	95.0%	8.9%	7.7%	91.1%	81.9%	4.3%	11.7%
SD	12.2%	13.9%	4.2%	4.7%	4.2%	13.4%	22.3%	21.6%
Médula espinal	Reinervación						“Fading”	
	IR _{min}	IR _{max}	IP _r	IP _g	RS _r	RS _g	Fd _{min}	Fd _{max}
R250	156%	125%	23%	14%	76%	59,3%	62%	53%
R251	61%	85%	8%	5%	91%	74,1%	-11%	20%
R253	73%	103%	14%	8%	85%	56,6%	23%	45%
R254	71%	66%	8%	3%	92%	52,9%	32%	26%
R255	56%	87%	6%	4%	93%	73,7%	-7%	30%
R257	55%	93%	14%	9%	85%	82,5%	-20%	29%
Media	79.2%	93.4%	12.6%	7.6%	87.4%	66.5%	13.2%	33.9%
SD	38.6%	19.9%	6.4%	3.9%	6.4%	11.8%	31.5%	12.3%

Estimación de la reinervación detectable.

$$\begin{aligned} \text{Índice de reinervación mínimo (IR}_{\min}) &= \text{total de regenerantes} / \text{total control} = \\ &= (\text{FBDY}+\text{FB})_{\text{exp}} / (\text{FB}+\text{DY}+\text{FBDY})_{\text{ctrl}} \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \text{Índice de reinervación máximo (IR}_{\max}) &= \text{total FB experimental} / \text{total FB control} \\ &= (\text{FBDY}+\text{FB})_{\text{exp}} / (\text{FBDY}+\text{FB})_{\text{ctrl}} \end{aligned}$$

El total de células regenerantes marcadas con el segundo trazador (FB+FBDY) en la extremidad lesionada respecto al total de las células marcadas en la extremidad control (FBDY+FB+DY), fue del 87.4±12.2% en células ganglionares y del 79.2±38.6 % en motoneuronas -sin diferencias significativas entre estos porcentajes, p=0.35- (columna IR_{min} de la Tabla 4), ascendiendo al 95.0±13.9% y 93.4±19.9% respectivamente, si se comparaba con el total de marcadas con el mismo trazador (FB+FBDY) en la extremidad control -sin diferencias significativas entre los ganglios y la médula espinal, p=0.60- (columna IR_{max} de la tabla 4).

Estimación de la inervación perdida.

$$\text{Inervación perdida relativa (IP}_r\text{)} = \text{DY}_{\text{exp}} / (\text{DY} + \text{FBDY})_{\text{exp}}$$

$$\text{Inervación perdida global (IP}_g\text{)} = \text{DY}_{\text{exp}} / (\text{DY} + \text{FBDY})_{\text{ctrl}}$$

Un $8.9 \pm 4.2\%$ de células ganglionares y un $12.6 \pm 6.4\%$ de motoneuronas de la extremidad experimental, respecto al total del mismo trazador en la misma extremidad, presentaban solamente el trazador aplicado con anterioridad a la lesión del nervio ciático (DY) (columna IP_r de la Tabla 4).

Un $7.7 \pm 4.7\%$ de células ganglionares y un $7.6 \pm 3.9\%$ de motoneuronas de la extremidad experimental, respecto al total del mismo trazador en la extremidad control, presentaban solamente el trazador aplicado con anterioridad a la lesión del nervio ciático (DY) (columna IP_g de la Tabla 4).

No existían diferencias significativas al comparar los índices de inervación perdida de ganglios lumbares y médula espinal usando el índice relativo ($p=0.35$) o el global ($p=0.75$). Por otro lado, las diferencias entre los índices relativo y global solamente fueron significativas en la médula espinal ($p=0.03$).

Estimación de la regeneración selectiva.

$$\text{Reinervación selectiva relativa (RSr)} = \text{FBDY}_{\text{exp}} / (\text{FBDY} + \text{DY})_{\text{exp}}$$

$$\begin{aligned} \text{Reinervación selectiva global (RSg)} &= \\ &= (\text{FBDY}_{\text{exp}} / (\text{FBDY} + \text{DY})_{\text{ctrl}}) / (\text{FBDY}_{\text{ctrl}} / (\text{FBDY} + \text{DY})_{\text{ctrl}}) \end{aligned}$$

El porcentaje de células doble marcadas (FBDY), respecto al total de las marcadas con el primer trazador en la extremidad experimental (FBDY+DY), fue del $91.1 \pm 4.2\%$ en los ganglios y del $87.4 \pm 6.4\%$ en la médula espinal (columna RS_r de la Tabla 4). Las diferencias entre ganglios lumbares y médula espinal no fueron significativas ($p=0.35$). Se denominó a este porcentaje “índice de reinervación selectiva relativo” (RS_r) por referir doble marcaje de la extremidad experimental al total de células marcadas con el primer trazador en la misma extremidad.

Los porcentajes de doble marcaje se reducían al $74.6 \pm 11.9\%$ y $52.4 \pm 7.2\%$ si el total de células marcadas tanto con FB y como con DY se comparaba con los totales de células ganglionares y motoneuronas respectivamente, marcadas con el primer trazador en la extremidad control (FBDY+DY); el mismo porcentaje de doble marcaje en la extremidad control era del $91.2 \pm 3.7\%$ en ganglios y del $79.4 \pm 6.6\%$ en motoneuronas. Si estos dos últimos cocientes, los hallados en la extremidad experimental y en la control, se relacionaban entre sí, se podía obtener una estimación de la reinervación selectiva global (RS_g), que resultaba ser del $81.9 \pm 13.4\%$ en los ganglios raquídeos y del $66.5 \pm 11.8\%$ en la médula espinal, siendo la diferencia entre ganglios y médula significativa con una $p=0.03$ (columna RS_g de la Tabla 4).

Estimación del “fading” del primer trazador.

Si multiplicamos el índice de reinervación (IR) -un 87%-95% en células ganglionares y un 79%-93% en motoneuronas en estos experimentos- por el total de células marcadas con el primer trazador en la extremidad control, se obtendrá un número de células de la población original que deberían teóricamente permanecer marcadas en la extremidad experimental. La relación entre el número esperable y el hallado se podría atribuir a desaparición del marcaje, “fading”. Según se aplique el IR_{\max} o el IR_{\min} , se detectará un mayor o menor “fading”.

$$\begin{aligned} \text{Mínimo “fading” detectable (FDmin)} &= 1 - (\text{DY hallado} / \text{DY esperable}) \\ &= 1 - ((\text{FBDY} + \text{DY})_{\text{exp}} / (\mathbf{IR}_{\min} * (\text{FBDY} + \text{DY})_{\text{ctrol}})) \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \text{Máximo “fading” detectable (FDmax)} &= 1 - (\text{DY hallado} / \text{DY esperable}) = \\ &= 1 - ((\text{FBDY} + \text{DY})_{\text{exp}} / (\mathbf{IR}_{\max} * (\text{FBDY} + \text{DY})_{\text{ctrol}})) \end{aligned}$$

Al realizar estos cálculos, el número de células que presentaban el trazador original fue entre un 4.3% y un 13.2% menor del esperable en los ganglios lumbares y entre un 11.7% y un 33.9% menor en la médula espinal (columnas FDmin y FDmax de la tabla 4). Si bien existían diferencias ligeramente significativas entre los índices máximos de ganglios lumbares y médula ($p=0.04$), no existían al comparar los índices mínimos ($p=0.35$).

4.3.2 Cuantificación de la selectividad en la reinervación de las falanges distales de los dedos de los pies y de la colateralización de nervios adyacentes no lesionados hacia territorios denervados.

En estos experimentos el FG se usó para marcar otros nervios diferentes al nervio ciático, que fue el que sufrió la lesión. Por tanto, los distintos cálculos para cuantificar supervivencia y especificidad en la regeneración de las neuronas del nervio ciático se han realizado excluyendo las células que contenían FG.

Los resultados comentados en los diferentes apartados de este capítulo se refieren a las tablas siguientes.

TABLA 5. Neuronas contadas en el experimento de reinervación de falanges distales de los dedos de los pies. Neuronas marcadas contadas en una de cada cinco secciones en los ganglios lumbares L4-L5.

	Experimental			Control		
	DY	FB	DYFB	DY	FB	DYFB
R236	27	34	30	5	82	12
R237	4	31	10	8	95	47
R238	5	36	9	13	6	43
R239	17	55	16	13	31	87
R240	24	42	15	26	49	52
R273	18	48	29	13	11	136
Media	15.8	41.0	18.2	13.0	45.7	62.8
DE	9.5	9.2	9.2	7.2	36.8	43.1

TABLA 6. Índices de reinervación, de inervación perdida, de regeneración selectiva y de “fading” en la reinervación de ramas nerviosas. Obtenidos tras operar con las cifras de la Tabla 5, según las fórmulas descritas en cada apartado del capítulo 4.3.2.

	Reinervación						“Fading”	
	IRmin	IRmax	IPg	IPr	RSr	RSg	FDmin	FDmax
R236	64.6%	68.1%	*	47.4%	52.6%	*	*	*
R237	27.3%	28.9%	7.3%	28.6%	71.4%	21.3%	6.9%	11.8%
R238	72.6%	91.8%	8.9%	35.7%	64.3%	20.9%	65.6%	72.8%
R239	54.2%	60.2%	17.0%	51.5%	48.5%	18.4%	39.1%	45.2%
R240	44.9%	56.4%	30.8%	61.5%	38.5%	28.8%	-11.4%	11.4%
R273	48.1%	52.4%	12.1%	38.3%	61.7%	21.3%	34.5%	39.8%
Media	52.0%	59.6%	15.2%	43.8%	56.2%	22.2%	26.9%	36.2%
DE	15.9%	20.6%	9.5%	12.0%	12.0%	3.9%	29.9%	25.7%

Estimación de la reinervación detectable.

$$\begin{aligned} \text{Índice de reinervación mínimo (IR}_{\min}) &= \text{total de regenerantes} / \text{total control} = \\ &= (\text{FBDY}+\text{FB})_{\text{exp}} / (\text{FB}+\text{DY}+\text{FBDY})_{\text{ctrl}} \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \text{Índice de reinervación máximo (IR}_{\max}) &= \text{total FB experimental} / \text{total FB control} = \\ &= (\text{FBDY}+\text{FB})_{\text{exp}} / (\text{FBDY}+\text{FB})_{\text{ctrl}} \end{aligned}$$

El total de células regenerantes marcadas con el segundo trazador (FB+FBDY) en la extremidad lesionada respecto al total de las células ganglionares marcadas en la extremidad control (FBDY+FB+DY), fue del 52.0±15.9%, ascendiendo al 59.6±20.6% si se comparaba con el total de marcadas con el mismo trazador (FB+FBDY) en la extremidad control (columnas IRmin y IRmax de la Tabla 6). Estos índices de reinervación mínimo y máximo en áreas distales fueron significativamente distintos a los hallados en áreas proximales (p=0.007 y p=0.02, respectivamente).

Estimación de la inervación perdida.

$$\text{Inervación perdida global (IP}_{\text{g}}) = \text{DY}_{\text{exp}} / (\text{DY} + \text{FBDY})_{\text{ctrl}}$$

$$\text{Inervación perdida relativa (IP}_{\text{r}}) = \text{DY}_{\text{exp}} / (\text{DY}+\text{FBDY})_{\text{exp}}$$

Un 15.2±9.5% de células ganglionares de la extremidad experimental, respecto al total del mismo trazador en la extremidad control, presentaban solamente el trazador aplicado con anterioridad a la lesión del nervio ciático (DY) (columna IPg de la Tabla 6).

Un 43.8±12.0% de células ganglionares, respecto al total del mismo trazador en la misma extremidad experimental, presentaban solamente el trazador aplicado con anterioridad a la lesión del nervio ciático (DY) (columna IPr de la Tabla 6).

Cuando los índices obtenidos en los ganglios lumbares tras estudiar las falanges distales de los dedos de los pies se compararon con los obtenidos tras estudiar la rama tibialis, no se obtuvieron diferencias significativas entre los índices globales (p=0.14) pero sí entre los relativos (p=0.004).

Estimación de la regeneración selectiva.

$$\text{Reinervación selectiva relativa (RSr)} = \text{FBDY}_{\text{exp}} / (\text{FBDY} + \text{DY})_{\text{exp}}$$

$$\begin{aligned} \text{Reinervación selectiva global (RSg)} &= \\ &= (\text{FBDY}_{\text{exp}} / (\text{FBDY} + \text{DY})_{\text{ctrol}}) / (\text{FBDY}_{\text{ctrol}} / (\text{FBDY} + \text{DY})_{\text{ctrol}}) \end{aligned}$$

El porcentaje de células doble marcadas (FBDY), respecto al total de las marcadas con el primer trazador en la extremidad experimental (FBDY+DY), fue del $56.9 \pm 13.2\%$, obteniéndose así el índice de reinervación selectiva relativo (columna RSr de la Tabla 6).

Este porcentaje de doble marcaje se reducía al $17.8 \pm 1.7\%$ si el total de células marcadas tanto con FB como con DY se comparaba con los totales de células ganglionares y motoneuronas respectivamente, marcadas con el primer trazador en la extremidad control (FBDY+DY); el mismo porcentaje de doble marcaje en la extremidad control era del $81.4 \pm 9.8\%$. Si estos dos últimos cocientes, los hallados en la extremidad experimental y en la control, se relacionaban entre sí, se podía obtener una estimación de la reinervación selectiva global, que resultaba ser del $22.2 \pm 3.9\%$ (columna RSg de la Tabla 6).

Tanto el índice de reinervación selectiva global como el relativo fueron significativamente distintos a los hallados en áreas proximales ($p=0.006$ y $p=0.004$).

El porcentaje de células doble marcadas respecto al total de las marcadas con el primer trazador en la extremidad control fue del $77.1 \pm 12.6\%$ en L4 y del $85.6 \pm 13.0\%$ en L5, sin diferencias significativas ($p=0.35$) (columnas Ctrol-L4 y Ctrol-L5 de la Tabla 7). En la extremidad experimental, el RS en L4 oscilaba entre el $14.1 \pm 4.5\%$ y el $43.7 \pm 13.7\%$ en L4 (columnas Exp-L4 y Exp-ctrl L4 de la Tabla 7), mientras que en L5 entre el $44.2 \pm 9.9\%$ y el $71.9 \pm 16.6\%$ (columnas Exp-L5 y Exp-ctrl L5 de la Tabla 7), siendo significativa tal diferencia ($p=0.03$ para RSr y $p=0.04$ para RSg).

TABLA 7. Regeneración selectiva diferencial según el ganglio. Doble marcaje en L4 y L5 de la extremidad control e índices de reinervación selectiva en los mismos ganglios de la extremidad experimental.

	Ctrol-L4	Ctrol-L5	Exp-L4	Exp-L5	Exp-ctrl L4	Exp-ctrl L5
	%FBDY _{ctrol} /(DY+FBDY) _{ctrol}		RSr		RSg	
R236	66.7%	100.0%	50.0%	58.8%		
R237	86.8%	82.4%	42.9%	100.0%	8.6%	52,2%
R238	79.5%	66.7%	55.6%	80.0%	15.2%	52,3%
R239	86.4%	89.4%	44.4%	53.3%	10.6%	47,1%
R240	56.8%	75.6%	17.4%	68.8%	19.9%	40,7%
R273	86.5%	98.3%	52.1%	70.8%	15.9%	28,6%
Media	77.1%	85.4%	43.7%	71.9%	14.1%	44,19%
SD	12.6%	13.0%	13.7%	16.6%	4.5%	9,92%

Estimación del “fading” del primer trazador.

Si aplicamos el índice de reinervación (IR) -un 52-59%- al total de células marcadas con el primer trazador en la extremidad control, se obtendría el número de células de la población original que deberían permanecer marcadas en la extremidad experimental. La relación entre el número esperable y el hallado se podría atribuir a desaparición del marcaje, “fading”. Según se aplique el IR_{max} o el IR_{min} , se detectará un mayor o menor “fading”.

$$\begin{aligned} \text{Mínimo “fading” detectable (FDmin)} &= 1 - (\text{DY hallado} / \text{DY esperable}) = \\ &= 1 - ((\text{FBDY} + \text{DY})_{exp} / (\mathbf{IR}_{min} * (\text{FBDY} + \text{DY})_{ctrl})) \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \text{Máximo “fading” detectable (FDmax)} &= 1 - (\text{DY hallado} / \text{DY esperable}) = \\ &= 1 - ((\text{FBDY} + \text{DY})_{exp} / (\mathbf{IR}_{max} * (\text{FBDY} + \text{DY})_{ctrl})) \end{aligned}$$

Al realizar estos cálculos, el número de células que presentaban el trazador original fue entre un 26.9% y un 36.2% menor del esperable en los ganglios lumbares (columnas FDmin y FDmax de la Tabla 6). No se encontraron diferencias significativas entre el “fading” máximo ni el mínimo entre áreas proximales y distales ($p=0.20$ en ambas comparaciones).

Estimaciones de colateralización.

Nervio femoral

En cuatro de los seis casos experimentales aparecían en L4 neuronas doble o triple marcadas con los trazadores aplicados en los pies (FB y/o DY) y en el nervio femoral (FG), si bien sólo en tres de los casos el FG se encontraba en neuronas únicamente marcadas con el segundo trazador (Tabla 8). La representación del nervio femoral respecto a la totalidad de neuronas del dedo oscilaba entre el 1% y el 5.7% en los casos en que estaba presente, con una media entre todos los casos experimentales (incluyendo aquellos en que no había representación femoral) de $2.0 \pm 2.2\%$. Sólo un caso control presentó representación femoral, que fue del 4.9% del total de inervación del dedo estudiado, siendo la media de representación femoral en controles del $0.8 \pm 2.0\%$. No hubo diferencias significativas entre grupos experimentales y grupos control ($p=0.27$).

TABLA 8. Participación de colaterales del nervio femoral. Número de neuronas que contenían FG, el trazador aplicado en el nervio femoral, contadas en una de cada cinco secciones ganglionares en L4.

L4	Exp					Ctrl				
	FBDYFG	FGDY	FGFB	FG	%femoral	FBDYFG	FGDY	FGFB	FG	%femoral
R236	0	0	0	112	0.0%	0	0	0	180	0.0%
R237	0	1	0	192	2.2%	0	1	7	124	4.9%
R238	0	0	3	251	5.7%	0	0	0	61	0.0%
R239	1	0	2	322	3.2%	0	0	0	115	0.0%
R240	0	0	0	142	0.0%	0	0	0	281	0.0%
R273	0	0	1	168	1.0%	0	0	0	264	0.0%
Media	0.2	0.2	1.0	197.8	2.0%	0.0	0.2	1.2	170.8	0.8%
SD	0.4	0.4	1.2	77.0	2.2%	0.0	0.4	2.9	87.4	2.0%

Nervio musculocutáneo.

En tres de los seis casos experimentales aparecían en L5 neuronas doble o triple marcadas con los trazadores aplicados en los pies (FB y/o DY) y en el nervio musculocutáneo (FG) (Tabla 9). En todos estos casos el FG se encontraba en neuronas ya marcadas con el primer trazador aplicado antes de la lesión (DY) y en un solo caso aparecía en tres neuronas marcadas con el trazador aplicado después de la regeneración, FB, pero sin el primero. La representación del nervio musculocutáneo respecto a la totalidad de neuronas del dedo oscilaba entre el 1.1% y el 4.0%, con una media entre todos los casos experimentales (incluyendo aquellos en que no había representación del nervio musculocutáneo) de $1.2 \pm 1.6\%$. Sólo en tres de los seis casos controles estaba representado del nervio musculocutáneo. Sólo uno de los casos coincidía con el que también se encontraba el nervio representado en la extremidad experimental. En los controles, la contribución del nervio musculocutáneo, cuando estaba presente, oscilaba entre el 2.5% y el 4.8% del total de inervación del dedo estudiado, siendo la media de representación del nervio del $1.7 \pm 2.0\%$ entre todos los casos. No hubo diferencias significativas entre grupos experimentales y grupos control ($p=0.69$).

TABLA 9. **Participación de colaterales del nervio musculocutáneo.** Número de neuronas que contenían FG, el trazador aplicado en el nervio, contadas en una de cada cinco secciones ganglionares en L5.

L5	Exp					Ctrol				
	FBDYFG	FGDY	FGFB	FG	%musc-cut.	FBDYFG	FGDY	FGFB	FG	%musc-cut.
R236	0	0	0	257	0.0%	2	0	3	93	4.8%
R237	0	0	0	317	0.0%	3	0	1	268	2.5%
R238	0	0	0	229	0.0%	0	0	0	192	0.0%
R239	0	2	0	301	2.2%	0	0	0	106	0.0%
R240	0	1	0	206	1.1%	0	0	0	222	0.0%
R273	0	1	3	546	4.0%	1	4	0	381	3.0%
Media	0.0	0.6	0.5	309.3	1.2%	1.0	0.6	0.7	210.3	1.7%
SD	0.0	0.8	1.2	123.3	1.6%	1.3	1.6	1.2	107.3	2.0%

Mayor selectividad de las neuronas de L5 para regenerar vs. persistencia de otras fuentes de inervación intactas.

Cuando pasados tres meses de una sección-sutura del nervio ciático éste fue de nuevo disecado y se le practicó una resección de 1.5 cm., se aplicaron inmediatamente después 1.5 μ l. de FB en el tercer dedo, tras lo cual no se visualizaron neuronas en el ganglio L4 en controles ni en experimentales (Tabla 10). Uno de los casos experimentales mostró 4 neuronas en L3. Dos de los tres casos experimentales presentaron 2 y 4 neuronas respectivamente en L5, mientras que el otro caso presentó 1 neurona en L6 y uno de los anteriores presentó 2. Ningún control presentó neuronas con FB en L3, cada control presentó 1 neurona en L5 y dos casos presentaron 3 y 2 neuronas, respectivamente, en L6.

En un solo caso, 2 neuronas de L6 marcadas con FB presentaban también FG, aplicado en los dedos cinco días más tarde de la inyección de FB, inmediatamente después de la resección de los nervios femoral y musculocutáneo.

TABLA 10. **Neuronas procedentes de colaterales.** Número total de neuronas con FB (atribuibles a colaterales de femoral o musculocutáneo) y número total de neuronas con FG (atribuibles a otras fuentes de inervación), obtenidas tras observar todos los cortes.

	FB	FG	FBFG		FB	FG	FBFG
L3 D				L3 I			
R267 D	0	0	0	R267 I	0	0	0
R268 D	4	0	0	R268 I	0	0	0
R269 D	0	0	0	R269 I	0	0	0
Media	1.3	0	0		0	0	0
L4 D				L4 I			
R267 D	0	0	0	R267 I	0	0	0
R268 D	0	0	0	R268 I	0	0	0
R269 D	0	0	0	R269 I	0	0	0
Media	0	0	0		0	0	0
L5 D				L5 I			
R267 D	0	0	0	R267 I	1	0	0
R268 D	2	0	0	R268 I	1	0	0
R269 D	4	0	0	R269 I	1	0	0
Media	2	0	0		1	0	0
L6 D				L6 I			
R267 D	1	0	0	R267 I	3	0	0
R268 D	0	0	0	R268 I	2	0	0
R269 D	0	0	2	R269 I	0	0	0
Media	0.3	0	0.7		1.7	0	0

5. DISCUSIÓN

Para estudiar la regeneración selectiva de las aferentes sensitivas del nervio ciático era preciso escoger un territorio de estudio para evaluar aquella regeneración, del cual era preciso conocer previamente la distribución normal de sus neuronas sensitivas en los ganglios raquídeos, asegurar la participación del nervio ciático en su inervación y adaptar a ella las técnicas trazadoras.

Desde el primer momento se contempló que tan importante era conocer cuántas neuronas acababan reinervando sus destinos más distales, como cuantificar cuántas se perdían ya en las primeras bifurcaciones del nervio ciático.

Se escogieron las falanges distales de los dedos de los pies por tratarse del área más distal del cuerpo de las ratas, inervadas por el nervio más voluminoso y por ser una zona en que se podría aplicar una técnica de doble marcaje con trazadores fluorescentes; uno de los cuales se inyectaría para marcar la población original del nervio y el otro para marcar la población regenerante. Los límites naturales de la zona hacían prever una limitada difusión de los trazadores, facilitando la reproducción de las sucesivas inyecciones.

Para todo ello se procedió a definir la distribución en los ganglios lumbares de los principales nervios de la extremidad inferior, así como de las falanges distales de los dedos de los pies. A continuación, se procedió a concretar la participación del nervio ciático en su inervación. Finalmente, se llevaron a cabo las distintas comprobaciones para estudiar la aplicabilidad de trazadores neuronales fluorescentes para el estudio de la selectividad de la regeneración.

5.1. Aspectos anatómicos

5.1.1 Somatotopía. Artículos 1 y 2.

Los principales nervios encargados de recoger la información sensitiva de la extremidad inferior son el femoral y el ciático. Las aferentes del nervio femoral se distribuyen desde L2 a L4, ganglio en que coincide con el nervio ciático, el cual se distribuye principalmente desde L4 a L6, con alguna aferente en L3. Según los resultados del presente estudio, ambos nervios se hallan en zonas diferenciadas dentro del ganglio L4, con una zona intermedia de solapamiento entre ambas poblaciones. Si bien la perfecta organización de las aferentes había sido repetidamente descrita en la médula espinal (Swett y Woolf, 1985; Grant, 1993), solamente se había apreciado anteriormente una clara organización en los ganglios en ratas embrionarias (Wessels, 1990; Mirnics y Koerber, 1995) o neonatales (Wessels y Marani; 1993), aunque también se había descrito cierto grado de organización en animales adultos de otras especies como la rana (Corner et al, 1978) y el gato (Kausz y Rethely, 1985).

Si bien la organización segregada de los nervios femoral y ciático es clara en L4, resulta más difícil confirmar la existencia de una organización somatotópica al analizar áreas más distales, como las falanges distales de los dedos de los pies. Aunque se puede percibir cierta tendencia de sus neuronas a distribuirse en determinadas partes del ganglio y no en otras, lo cierto es que las células se hallan más difusamente localizadas.

Así, sólo al integrar las diferentes proyecciones de los distintos dedos en un solo ganglio, se apreciaba cierta tendencia de las neuronas del dedo 4 a situarse en las partes más rostrales de L5, respecto a las neuronas del dedo 5, que se situaban en las partes más caudales; distribución que se repitió al estudiarla específicamente en otros casos. En el resto de ganglios, las distintas poblaciones se solapaban. De hecho, ya se había descrito previamente en ratas adultas la tendencia de las neuronas sensitivas primarias a distribuirse en agrupaciones, dentro del tejido ganglionar, si bien su localización concreta no era reproducible (Peyronnard et al, 1986a, 1990). La organización rostrocaudal de las proyecciones centrales de las fibras aferentes de los dedos de los pies se había descrito también en las láminas de la médula espinal (Molander y Grant, 1985; Shortland y Wolf, 1993), pero su correspondiente organización en los ganglios resultaba más difícil de demostrar (Wessels et al, 1994).

La utilización en nuestro estudio de reconstrucciones tridimensionales colaboró a evidenciar esta abigarrada distribución. Si bien existían numerosos precedentes de reconstrucciones tridimensionales de estructuras nerviosas (Prats-Galino et al, 1988; Filiano et al, 1990; Funnell et al, 1990; Peyronnard et al, 1990; Bayer et al, 1991, 1994; Huang et al, 1993; Mc Ritchie y Türk, 1993; Ishihara et al, 1995), no se trataba de una técnica extensivamente utilizada para el estudio de la somatotopía.

De haberse hallado una distribución más definida de las neuronas de un determinado dedo, podría utilizarse el estudio de su grado de desestructuración como un índice de desvío en la reinervación de los destinos distales, al igual que previamente se había utilizado la pérdida de organización del núcleo del nervio facial o de las motoneuronas del ciático (Aldskogius y Thomander, 1986; Aldskogius et al, 1987) para estudiar la selectividad en la reinervación de estas células. Sin embargo, la somatotopía real de las neuronas que inervan las falanges distales de los dedos de los pies dificulta un estudio de la selectividad basado únicamente en criterios de topografía. Resulta imprescindible pues, desarrollar la técnica complementaria del doble marcaje con trazadores fluorescentes.

5.1.2. Inervación de las falanges distales de los dedos de los pies. Artículo 3.

Al realizar un experimento control que contemplaba la inyección de las distintas falanges distales de los dedos de los pies, así como la sección de los nervios ciático y femoral, se descubrió la presencia repetida de neuronas marcadas en el ganglio L5, indicativas de otra fuente de inervación. La eliminación de aquellas células tras la sección de otras ramas más proximales del nervio ciático, combinada con la lesión de los nervios ciático y femoral, sugería la participación de aquellas ramificaciones en la inervación distal, probablemente a través de anastómosis que tenían lugar distalmente a la zona habitual de sección-sutura del nervio ciático, en la parte media del muslo. El estudio detallado de la participación de cada nervio en las falanges distales llevó a concretar la participación mayoritaria del ciático en todos los dedos, en particular por sus aferentes de L4 y L5, mientras que el nervio femoral vehiculizaba la práctica totalidad de las aferentes procedentes de L3 y aproximadamente un 10% de las procedentes de L4 dirigidas a los dedos 1 y 2. El aquí denominado nervio musculocutáneo participaba solamente en hasta un 5% de la inervación procedente de L5 hacia todos los dedos. Las proyecciones procedentes de L6 eran absolutamente minoritarias, siendo de 13 neuronas aferentes de media para el total de los cinco dedos. Las únicas descripciones previas del nervio que hemos denominado musculocutáneo se limitaban a ilustraciones en que se representaba su origen en el ciático proximal, su

inervación del músculo bíceps y en que se dejaba incompleto su ramo distal cutáneo (Greene, 1963). Asimismo, la descripción de la inervación del bíceps se había estudiado específicamente, sin describir el destino del resto de ramos del nervio implicado (Manzano y McComas, 1988).

En cuanto al nervio femoral, se había descrito con anterioridad su participación en la inervación de los dedos 1 y 2, así como de las áreas más proximales del dedo 3 (Wiesenfeld-Hallin et al, 1989). En nuestro estudio no se apreciaba que tal inervación alcanzase las áreas más distales, puesto que las aferentes de aquel dedo quedaban mayoritariamente eliminadas tras la sección del nervio ciático. Por tanto, la elección de ese dedo podía constituir un buen modelo para la regeneración, al asegurar la práctica exclusividad del nervio ciático en la inervación de la falange distal, pero contando con aferentes del femoral en sus proximidades, que podrían potencialmente enviar colaterales a la zona denervada, pudiendo también analizar en los mismos experimentos el grado de colateralización desde nervios adyacentes.

5.2 Aspectos técnicos

5.2.1 Marcaje en ramas nerviosas. Artículo 4.

La práctica totalidad del doble marcaje tras la aplicación secuencial de DY y FB al extremo del nervio ciático sugería la complementariedad de ambos en el marcaje de una única población neuronal.

Con la finalidad de estudiar la selectividad en la reinervación de las ramas de la primera bifurcación del nervio ciático, se podía marcar una de ellas mediante la inyección de uno de los trazadores y volverla a marcar pasado el periodo de regeneración. El marcaje de la rama mediante inyección se hacía preferible a otras técnicas por suponer una menor agresión al nervio, aunque hacía temer que el trazador pudiese no alcanzar la totalidad de las fibras a marcar (Taylor et al, 1983). De todas formas, se aceptaría como la técnica para marcar a la población original, aunque solamente se consiguiese marcar una muestra de ella. La aplicación del segundo trazador en cápsula, después del periodo de regeneración sí que aseguraría el contacto del segundo trazador con la totalidad de las fibras que alcanzasen nuevamente la rama, permitiendo detectar a la totalidad de la subpoblación de estudio, si regenerase adecuadamente.

Tras la inyección de DY y la aplicación mediante cápsula de FB como segundo trazador se observó el doble marcaje de más del 90% de las células que contenían DY, sin existir diferencias significativas en el número de células marcadas con uno u otro, lo cual sugería que tanto la aplicación de los trazadores en inyección como en cápsula parecía ser igual de eficaz para marcar las neuronas de la rama tibialis del nervio ciático.

En cuanto a qué trazador utilizar en primer lugar y cuál en segundo, el número de doble marcadas se reducía drásticamente al utilizar el FB como primer trazador, seguido de una cápsula de DY. Así, se observaba un 10% de doble marcaje si la aplicación era el mismo día y solamente se alcanzaba un 70% de doble marcaje si la segunda aplicación se dilataba unos meses, lo cual resultaba altamente sugestivo de una interacción entre el FB y la sucesiva captación de DY. La secuencia inversa, aplicación de DY seguida de marcaje con FB, conseguía en cambio más del 90% de doble marcaje, sin disminución del DY con los meses, resultando por consiguiente preferible esta segunda combinación de trazadores.

De demostrarse eficaz esta combinación, podía resultar una alternativa a otras ya ensayadas que comportaban el uso de FG con HRP (Brushart, 1990) o con DiI (Madison et al, 1996) o con FB (Popratiloff et al, 2001), trazadores que se visualizan desde distintos filtros y que, en el caso de HRP, precisan un adicional procesamiento histoquímico. También resultaría una alternativa al uso de dextran aminas, que precisan de la sección de los nervios para su aplicación (Fritsch y Sonntag, 1991).

5.2.2 Marcaje en falanges distales de los dedos de los pies. Artículo 5.

Conseguir un número similar de neuronas tras el doble marcaje en las falanges distales de los dedos de los pies con FB, FG y DY, era sugestivo de que también tras la aplicación mediante la inyección subcutánea de estos trazadores se mantenía una eficacia comparable, mientras que se habían encontrado diferencias entre esos trazadores al aplicarlos en otras localizaciones (Hendry et al, 1986; Horikawa y Powell, 1986; Richmond et al, 1994), posiblemente por la diferente capacidad de difusión de los distintos trazadores al aplicarlos en áreas con límites menos precisos. Tras la inyección de la misma cantidad de los trazadores en nuestro estudio se alcanzaban cifras de doble marcaje de alrededor de un 75%, lo cual era sugestivo de que la zona marcada difería ligeramente de inyección a inyección. El hecho de que con el aumento de la cantidad de segundo trazador se aumentase también el porcentaje de doble marcaje sugería que así se ayudaba a cubrir la extensión del área alcanzada en la primera aplicación entre un 81% y un 84%. Los porcentajes de futuros estudios de regeneración en que se usasen dos trazadores deberían tener en cuenta la dificultad para conseguir un 100% de marcaje en animales controles, realizando las correcciones oportunas.

5.2.3 Aplicación en la regeneración: “fading” del primer trazador, capacidad de neuronas regenerantes para captar trazadores, interacciones en la captación del segundo trazador. Artículo 6.

Una vez hallados tres trazadores visualizables desde el mismo filtro y que parecían marcar un número similar de neuronas, era oportuno someterlos a una situación real de regeneración para verificar si se mantenía el acúmulo en los somas del fluorocromo que se utilizase como primer trazador, para comprobar la capacidad de las neuronas regenerantes para captar de forma homogénea cualquiera de ellos o para descartar interacciones del primer trazador que interfiriesen la captación del segundo.

Las primeras diferencias se observaron al aplicar los tres trazadores distalmente a la sutura de nervios ciáticos lesionados que no habían sido anteriormente marcados. El DY marcó menos neuronas que los otros trazadores, resultando significativamente menos eficiente que el FG para marcar motoneuronas. Asimismo, ese número era aún menor si se aplicaba a nervios previamente marcados, en particular si las neuronas originales estaban marcadas con FG, lo cual sugería un papel adicional de ese trazador en dificultar la captación del DY. Las dificultades de neuronas regenerantes para marcar trazadores habían sido previamente descritas para el enzima HRP (Peyronnard, 1986b, 1988). De los tres trazadores estudiados el DY es el más afectado por este fenómeno, viéndose doblemente limitado cuando existe un marcaje previo con FG.

De nuevo se apreciaban diferencias al comparar el número de células que, a los tres meses de su aplicación, permanecían marcadas. En este caso el número de motoneuronas marcadas con FG era significativamente inferior al del resto de trazadores. Esta reducción era susceptible de ser atribuible a la pérdida del marcaje más

que a un efecto tóxico de este trazador, aunque este efecto tóxico había sido propuesto por algunos autores (Garrett et al, 1991; Naumann et al, 2000) y rechazado por otros (Novikova et al, 1997). En nuestro estudio, en el grupo inicialmente marcado con FG se apreciaba paralelamente un incremento de células que solamente presentaban DY, el segundo trazador aplicado. Todo ello, así como la similitud de los potenciales electrofisiológicos obtenidos en este grupo respecto al resto, sugería que se trataba de células que en algún momento habían contenido FG, que habían perdido su marcaje, pero que se encontraban vivas y capacitadas para captar de nuevo otro trazador si tenían oportunidad. Estos resultados discreparían de un estudio previo que describía la permanencia del FG durante al menos un año (Divac y Mogensen, 1990), si bien en aquel estudio no se precisan los totales neuronales, obtenidos en poblaciones del sistema nervioso central.

Finalmente, el porcentaje de doble marcaje fue superior en el grupo que recibió inicialmente DY y sucesivamente FB. En ese grupo también se apreció hasta un 20% de células ganglionares y un 8% de motoneuronas que solamente presentaban FB, acreditando cierta pérdida de marcaje por parte del DY. Este dato parecía contradecirse con los resultados previos de marcaje DY a los dos meses de su inyección en ramas nerviosas de animales controles, que eran similares a los obtenidos al cabo de cinco días. Sin embargo, es posible que en aquel diseño el DY permaneciese en el lugar de aplicación (Innocenti et al, 1986; Rende et al, 1991), estando disponible para ser captado de forma permanente por parte de los axones que proyectaban al nervio tibialis, puesto que no habían sido lesionados, permitiendo un retrotransporte constante durante semanas, contribuyendo a mantener el marcaje. En cambio, en el marcaje de la sección-sutura, el primer trazador es limpiado del extremo del nervio ciático después de su aplicación.

La nula alteración de los potenciales electrofisiológicos después de la inyección de suero fisiológico en el nervio contribuye a reforzar el uso de esta técnica para la aplicación del primer trazador.

Considerando los defectos de marcaje del DY como segundo trazador y la reducción del FG en motoneuronas, la combinación DY-FB presentaba menos inconvenientes, si se desea un diseño de doble marcaje. Por otro lado, tanto FB como FG parecen tener una eficacia similar cuando se usan solos para cuantificar neuronas regenerantes.

A partir de estas consideraciones se podría también definir un *índice de regeneración*, dividiendo el total de células marcadas con el segundo trazador del total de neuronas obtenido en un nervio control, tras la aplicación de una cápsula en el nervio ciático y de la perfusión de la rata a los cinco días. En estos experimentos, considerando el marcaje de FB o de FG aplicados después de la regeneración, y los resultados obtenidos en el nervio ciático control, detallados en la sección *Aplicación en cápsula* del apartado 4.2.1, el porcentaje se situaba alrededor del 55%, tanto en ganglios raquídeos como en la médula espinal.

De todas formas, la sección bilateral realizada en este estudio puede no hacerlo estrictamente comparable con otros trabajos en los que se realice una sección unilateral, usando la extremidad no lesionada como control, puesto que se han descrito cambios en el miembro contralateral al lesionado (Patchter y Eberstein, 1991; Koltzenburg et al, 1999; Yamaguchi et al, 1999) que podrían estar interactuando aquí en ambas extremidades por haber sido lesionadas las dos.

5.2.4 Verificación de si el primer trazador permanece en el área de aplicación, pudiéndose captar varios meses después por axones regenerantes, pudiendo aparecer además en neuronas que no pertenecían a la población original. En preparación para publicación.

Esta posibilidad había sido sugerida anteriormente para el trazador FB (Innocenti et al, 1986; Rende et al, 1991) pero no directamente demostrada. Sin embargo, del DiI se ha descrito su persistencia objetivable en el lugar de aplicación durante meses (Popratiloff et al, 2001).

La sección y reparación del nervio ciático al principio del experimento, junto con la espera de dos días para la aplicación de los trazadores en el nervio tibialis tiene por objeto impedir que estos trazadores puedan acceder a los somas a través de los axones originales del nervio. La ausencia de neuronas marcadas en los experimentos controles, perfundidos a los cinco días de la sección-sutura, nos asegura que este impedimento es eficaz. Solamente nuevos axones regenerantes que, después de semanas de regeneración, lleguen a la zona en que se aplicó el trazador podrán encontrar sus restos y, de estar disponible, podrán captarlo y transportarlo hacia el soma. La presencia de neuronas marcadas en los experimentos en que se aguardaron dos meses de regeneración es indicativo de que este proceso tiene lugar para todos los trazadores estudiados, siendo el FG el que presenta menos neuronas y el FB el que más. Aquí hemos llamado “*recaptación*” a ese proceso.

Es posible que en el reducido número de neuronas marcadas con FG se combine un efecto de baja “*recaptación*”, con otro de “*fading*”, como ya habíamos sugerido en experimentos anteriores. En cualquier caso, deberá considerarse que se puede producir recaptación en alrededor del 35% de la población ganglionar si se usa FB, en un 17% si se usa DY y en un 9% se usa FG, porcentajes que en la médula espinal son del 48%, 13% y 3%, respectivamente, debiendo tenerse en cuenta este efecto en experimentos de regeneración.

El mismo proceso se reproduce al aplicar los trazadores en las áreas más distales, los extremos de los dedos de los pies. El FB se recapta en una proporción similar, un 30% de la población, mientras que sólo unas pocas neuronas (2 de media), permanecen marcadas con DY y no aparecen neuronas marcadas con FG. Puesto que los axones acceden a aquellas áreas más tarde que al nervio tibialis, es posible que el estado de los trazadores DY y FG ya no sea el adecuado para captarlos. Igualmente, al ser observados a tres meses, también puede influir cierto “*fading*” en los somas de neuronas cuyos axones hubiesen podido regenerar precozmente y captar los trazadores. Por tanto, el proceso de “*recaptación*” como interferencia en estudios en que el DY o el FG se utilicen como primeros trazadores en áreas distales es prácticamente insignificante.

5.3 Aspectos de regeneración. En preparación para publicación.

5.3.1 Cuantificación de la selectividad en la reinervación de ramas nerviosas después de la primera bifurcación del nervio ciático.

Estimación de la reinervación detectable.

Si bien en experimentos que incluyesen el estudio de la totalidad del nervio ciático se podría considerar el número total de células marcadas visibles como la *máxima supervivencia detectable*, al estudiar las ramas nerviosas en particular este índice no puede emplearse: en caso de un desvío masivo de neuronas podríamos encontrarnos con una gran población de nuevas regenerantes, dirigidas ahora a hacia la rama de estudio, y un gran desvío de la población original hacia otros destinos, obteniendo un número superior al de la población inicial en caso de sumar el total de células marcadas visualizables.

Podemos, sin embargo, establecer un *índice de reinervación*, referente al total de inervación que recibe la rama de estudio respecto al que disponía inicialmente. En principio, puesto que la población regenerante contendrá el segundo trazador (FB), aplicado en cápsula, al igual que en la extremidad control, podría compararse el total de células marcadas con FB en ambas extremidades. Sin embargo, esta comparación se ve afectada por la diferente visualización del FB, según nos encontremos en el lado experimental o en el control, observada en estos animales.

En el lado control, el marcaje del DY es muy intenso, probablemente por su captación continua en el punto de aplicación durante meses, obteniéndose unos índices de doble marcaje con FB de 91.2% en ganglios y de un discreto 79.4% en motoneuronas en estos animales. Sin embargo, en el lado experimental el DY sólo se capta durante unos minutos el día de la primera aplicación del trazador, desvaneciéndose a lo largo del tiempo y permitiendo un marcaje más intenso del segundo trazador. Así, mientras que el total de FB en el lado experimental se puede corresponder de forma bastante aproximada con el total de neuronas regenerantes, el total de FB en el lado control es con seguridad ligeramente inferior a la población de la rama en estudio, debido a su menor visualización por la intensidad del DY. De ello se desprende que el índice de reinervación calculado mediante el cociente entre el marcaje de FB en las dos extremidades (95% en ganglios y 93% en la médula espinal) será una ligera sobreestimación de la reinervación real.

Una opción para contrarrestar tal sobreestimación es referir el total de regenerantes del lado experimental a la totalidad de neuronas marcadas en la extremidad control. De todas formas, puesto que el número total de células marcadas siempre es ligeramente superior al alcanzado por uno solo de los dos trazadores, el índice así calculado (87% en ganglios y 79% en la médula espinal) representa una probable infraestimación de la reinervación.

En cualquier caso, un rango del 87-95% de reinervación en ganglios y del 79-93% en la médula espinal nos sugiere de forma bastante aproximada un alto índice de reinervación de la rama tibialis después de la sección-sutura del nervio ciático. Estos datos se hallan en la línea de estudios previos, en que los índices de regeneración cuantificados eran altos, sugiriendo que la mayoría de neuronas sobreviven y regeneran (Fritsch y Sonntag, 1991; Al-Majed et al, 2000).

No disponemos de datos a partir de estos experimentos para concluir si esta reinervación es homogénea en el resto de ramas del ciático. De hecho, este *índice de*

reinervación es superior al *índice de regeneración* (apartado 5.2.3), situado alrededor del 55% en los experimentos de sección-sutura con marcaje del tronco del nervio ciático. Por un lado es posible que el grado de reinervación del resto de ramas del ciático sea inferior a la de la rama tibialis, existiendo una regeneración media del 55% cuando se considera el global del nervio. Otra posibilidad es que el grado de regeneración en el estudio del tronco del nervio ciático fuese inferior al del estudio de las ramas por la agresión adicional sufrida por el tronco del nervio durante la aplicación de las sucesivas cápsulas. Así, en los presentes experimentos, una sola rama del nervio se expone durante breves minutos para realizar una rápida inyección. La inyección es un mecanismo de aplicación menos agresivo que la exposición total del nervio durante treinta minutos, su sección, la manipulación del extremo distal para la colocación y retirada de la cápsula y la realización de una sutura sin prealineación; proceso a que fueron sometidos los animales en que se calculó el *índice de regeneración*. Por tanto, es plausible que la superior manipulación del nervio haya conducido a una menor regeneración en aquel estudio.

De hecho, en algún estudio se han descrito índices de regeneración en neuronas sensitivas situados alrededor del 60%, si bien en aquel trabajo el extremo proximal del nervio seccionado se anastomosaba al extremo distal de un nervio distinto (Baranowsky et al, 1994), no siendo absolutamente comparable con nuestros datos.

Estimación de la inervación perdida.

Entenderemos por *inervación perdida* aquel porcentaje de las neuronas originales de una rama que, o bien no han regenerado, o bien lo han hecho desviándose a otros destinos. En un modelo de trazadores ideal el índice de *inervación perdida* debería ser complementario al de *regeneración selectiva*, de forma que uno más el otro se deberían corresponder con la totalidad de la inervación original del nervio. Sin embargo, por los diferentes procesos que afectan la captación y visualización de los trazadores, los respectivos cocientes son representativos de un índice o del otro, pero no de forma complementaria, debiéndose establecer, una vez más, rangos que engloben el posible resultado real. En el modelo teórico de doble marcaje, la *inervación perdida* de la extremidad experimental se correspondería con las células que presentasen únicamente el primer trazador.

El total de las células que en la extremidad experimental presentan únicamente el trazador aplicado al principio puede referirse al total de células marcadas con el mismo trazador en la extremidad control (índice global) o en la misma extremidad experimental (índice relativo). Aquí, ambos índices dan resultados parecidos, entre el 7.7 y el 8.7% en los ganglios lumbares y el 7.6 y 12.6% en la médula espinal. La *inervación perdida* real podría ser algo mayor si algunas de las células que fueron marcadas inicialmente perdieron el trazador por el paso del tiempo, como se discutirá más adelante. De todas formas, la magnitud real de desvío y falta de regeneración podría ser también algo menor si tenemos en cuenta que ni siquiera en los controles el segundo trazador suele marcar la totalidad de células marcadas con el primero, dejando de forma constante un cierto porcentaje de células únicamente marcadas con éste. En estos mismos experimentos, el grupo control ya presentaba un 8%-20% de células en ganglios lumbares y médula espinal que solamente estaban marcadas con DY, porcentajes comparables a los experimentales, por lo que el número de células simple marcadas atribuibles a posibles desvíos sería reducido. Así pues, el porcentaje de desvío

objetivable en esta primera bifurcación del ciático es mínimo, tanto en células ganglionares como en motoneuronas.

Estudios precedentes ya sugerían que el desvío en las primeras bifurcaciones del nervio ciático, evaluado aplicando diferentes trazadores en distintas ramas del nervio, antes de la lesión y después de la regeneración, y observando que el aumento de células doble marcadas era mínimo (Molander y Aldskogius, 1992). Otras formas directas de objetivar el desvío incluían la observación de la alteración del patrón topográfico de las motoneuronas de la médula espinal al estudiar la población regenerante de las ramas nervio ciático (Aldskogius et al, 1987; Brown y Hardman, 1987; Shenaq et al, 1989), o del nervio femoral, observando la aparición de motoneuronas en la rama sensitiva (Brushart, 1990; Rath y Green, 1991), que sí que ponían de manifiesto cierto grado de desvío, pero que no permitían acreditar el destino de las neuronas sensitivas.

Estimación de la regeneración selectiva.

En un modelo teórico, la forma directa de objetivar el número de neuronas que han regenerado selectivamente se basaría en la cuantificación de aquellas que presentan ambos trazadores, el aplicado al principio y el aplicado después de la regeneración en la misma localización (FBDY). Sin embargo, debemos tener en cuenta que algunas de ellas pueden haber sufrido el fenómeno de la “*recaptación*”; es decir, si bien pertenecían a otras ramas nerviosas, han regenerado erróneamente a la rama de estudio, captando restos del primer trazador y, a su vez, el segundo, aplicado para marcar las neuronas regenerantes, presentando también marcaje de los dos trazadores. En consecuencia, no todas las células doble marcadas se corresponderían con células que hubiesen regenerado adecuadamente. En el caso del uso de DY como primer trazador, este fenómeno podía afectar aproximadamente a un 15% de la población original del nervio tibialis, como vimos anteriormente. De todas formas, si consideramos que las neuronas que hayan regenerado adecuadamente pueden volver a captar otra vez el trazador que ya poseían, no debemos descontar la totalidad del 15%, especialmente considerando el bajo número de desviadas objetivadas antes con el único marcaje del primer trazador.

El número de células doble marcadas se podría referir al total de la población original en la rama experimental, identificada como la totalidad de las que presentan el primer trazador $(FBDY+DY)_{exp}$, obteniendo así una selectividad de un 90% aproximadamente, tanto en ganglios raquídeos como en la médula espinal. De todas formas, este cociente, representativo de la *regeneración selectiva relativa*, podría no ser el más adecuado considerando que el total de células que permanecen marcadas en el lado experimental puede ser menor del esperable por un mayor “*fading*” en esa extremidad (ver *estimaciones de reinervación detectable* en el presente apartado de la Discusión).

Podríamos, en cambio, comparar también el número de neuronas doble marcadas con el de las marcadas con el primer trazador en la extremidad control, representativas de la población original. Por lo comentado anteriormente el grado de “*fading*” de esta población sería mínimo por la existencia del fenómeno de captación continua de trazador desde el punto de aplicación. El nuevo porcentaje, así calculado, se reduciría al 74% en células ganglionares y al 53% en motoneuronas. De nuevo cabe señalar, no obstante, que el porcentaje de doble marcaje en la extremidad control no es del 100%, por lo que sería oportuno comparar los porcentajes anteriores con sus respectivos en la extremidad control, es decir, a los obtenidos tras dividir el total de dobles marcadas en la extremidad control respecto al total del primer trazador en esa

extremidad. Alcanzamos así el *índice de reinervación selectiva global*, que sería del 81.9% en los ganglios y del 66.5% en la médula espinal. Este índice, a su vez, incluye una cierta sobreestimación, puesto que el total de doble marcaje en la extremidad control, que se sitúa en el denominador del cociente, está ligeramente disminuido por el intenso marcaje del DY que dificulta la visualización del FB.

La mayor facilidad de las neuronas sensitivas para regenerar había sido propuesta previamente (Suzuki et al, 1998). Asimismo, la selectividad de las neuronas, tanto sensitivas como motoras, para escoger su rama de origen también había sido previamente descrita mediante técnicas de doble marcaje en el nervio femoral (Madison et al, 1996). No obstante, en aquel estudio no se discutió el posible efecto de una eventual “recaptación” en los resultados.

Estimación del “fading” del primer trazador.

El total de células marcadas con el segundo trazador en la extremidad experimental respecto a la extremidad control se correspondería con el *índice de reinervación* -un 87-95% en células ganglionares y un 79-93% en motoneuronas en estos experimentos-. Se podría pensar que en el caso de un grado de reinervación homogéneo entre todas las ramas del nervio ciático tras la lesión-sutura, el índice hallado en una rama podría corresponderse con el número de neuronas supervivientes detectables, pues todas aquellas que han regenerado y captado el segundo trazador deben estar vivas. De aplicarse entonces estos porcentajes al total de células marcadas con DY en la extremidad control, se obtendría el número de células que es esperable encontrar con el mismo trazador, el destinado a marcar la población original en la extremidad experimental. La relación entre el número esperable y el hallado se podría atribuir a desaparición del marcaje, “fading”, que sería mayor o menor según se aplique el IR_{max} o el IR_{min} .

Los porcentajes así obtenidos, 4-11% en los ganglios y 13-33% en la médula espinal, podrían ser una infraestimación del verdadero grado de “fading” si tenemos en cuenta la posible existencia de una población original superviviente que no haya regenerado, pero que hubiera tenido acceso a la captación del primer trazador y a su vez también lo haya perdido. Al haber cuantificado el número de marcaje esperable a partir del índice de reinervación, que no contempla aquella población, estamos infraestimando el DY que debería encontrarse y, en consecuencia, infraestimando el proceso. En cualquier caso, dado que el índice de reinervación es alto en estos experimentos, alrededor del 90% de la población original, el porcentaje de neuronas supervivientes no regenerantes sería reducido, afectando poco al porcentaje de “fading” calculado.

También debe tenerse en cuenta la posible afectación del índice por el proceso de “recaptación”. En ese supuesto, las neuronas regenerantes, originariamente pertenecientes a otras ramas y ahora desviadas hacia nuestra rama de estudio, captarían a su vez el trazador aplicado meses atrás, el DY, sumándose a las pertenecientes a la población original, obteniéndose una cifra de DY mayor a la esperable a partir de cálculos basados en el índice de reinervación. Al encontrarse más DY, el “fading” calculado sería menor, traduciéndose de nuevo en una infraestimación del “fading” real. Considerando que el grado de recaptación del DY se sitúa alrededor del 15%, en el peor de los casos el “fading” podría estar infraestimado en esa magnitud. Sin embargo, considerando el alto grado de *regeneración selectiva*, junto con el bajo índice de inervación perdida, y por tanto, una población reducida de nuevas desviadas que

implicaría una reducida “recaptación”, parece plausible que el “fading” real esté comprendido alrededor del rango calculado inicialmente.

En cualquier caso, la homogeneidad en el índice de reinervación de las distintas ramas del ciático es un requisito para la aplicación de estos cálculos. Para explicar este requisito, supongamos el caso hipotético de un desvío masivo de neuronas de otras ramas hacia la rama de estudio, desplazando a la población original, que podría no inervar otros destinos y morir, perdiendo así el marcaje. El “fading” calculado a partir del índice de reinervación de la rama original por parte de nuevas neuronas estaría presuponiendo la existencia de una población original que en realidad habría muerto. Sin embargo, si la población original regenerase en grado similar a nuevos destinos del mismo nervio ciático, el índice de “fading” calculado a partir del índice de reinervación sería aplicable. De nuevo, el alto grado de *regeneración selectiva* en los resultados presentados y el bajo grado de *inervación perdida* nos permiten aplicar los cálculos de “fading” a los presentes resultados con un razonable margen de seguridad.

El problema del “fading” de los trazadores ha sido principalmente abordado en estudios directamente diseñados para evaluar la permanencia de éstos (Novikova et al, 1997), pero no hemos encontrado referencias de su interferencia en estudios de regeneración selectiva en ramas nerviosas. Sí que se ha analizado, sin embargo, en algún estudio de regeneración selectiva de los destinos distales, así que su implicación será discutida en ese apartado.

5.3.2 Cuantificación de la selectividad en la reinervación de las falanges distales de los dedos de los pies y de la colateralización de nervios adyacentes no lesionados hacia territorios denervados.

En estos experimentos se pretendía evaluar la regeneración del nervio ciático así como la contribución de nervios adyacentes a la inervación del territorio que hubiese quedado temporalmente denervado. Puesto que la aplicación de cualquier trazador en cápsula permite el marcaje de la práctica totalidad de las neuronas de un nervio determinado, se asumió que las neuronas que no presentasen FG, el trazador aplicado en los nervios femoral y musculocutáneo, pertenecerían al nervio ciático y serían, pues, las que se emplearían para los cálculos de los índices de reinervación y regeneración de tal nervio.

Estimación de la reinervación detectable.

En el apartado de reinervación de ramas nerviosas se comentaba el por qué el número total de células regenerantes, marcadas con el segundo trazador, se comparaba con el total de células marcadas con el mismo trazador en la extremidad control o con el total de células marcadas con cualquiera de los trazadores en aquella extremidad, por las diferencias existentes en la visualización del FB debidas a la intensidad del marcaje del DY en los controles en aquellos experimentos.

Sin embargo, nuevas consideraciones deben tenerse en cuenta al aplicar el modelo en áreas distales. Cuando el DY es usado como primer trazador para marcar las células que proyectan a los dedos, acaba presentado una intensidad de marcaje similar en ambas extremidades. Este hecho puede explicarse por varias razones. En primer lugar, la aplicación directa de trazador en el nervio puede producir una mayor captación en comparación con la aplicación subcutánea. En segundo lugar, parece ser que el DY

se degrada en el lugar de aplicación antes de los tres meses de regeneración, como lo sugiere el bajo índice de recaptación de este trazador en áreas distales, que es prácticamente nulo, mientras que ascendía a un 15% aproximadamente cuando se aplicaba en el nervio tibialis. Por tanto, aunque en la extremidad control el DY se haya podido estar captando de manera continua durante más tiempo, no se produce su captación a lo largo de todo el periodo, pudiendo tener lugar cierto grado de “*fading*” también en aquella extremidad.

Si incluso en ramas nerviosas, cuando el marcaje de DY era probablemente más intenso, el FB conseguía marcar hasta el 90% de la población, podemos suponer que en áreas distales el marcaje de FB represente con bastante precisión a la totalidad de células regenerantes en la extremidad experimental y a la población control en la otra. Por tanto, el *índice máximo de reinervación*, obtenido al comparar el FB de ambas extremidades, situado en el 59% en estos casos, puede ser muy aproximado, teniendo menos sentido el usar complementariamente el índice mínimo de reinervación, por representar una segura infraestimación.

Este índice de reinervación se sitúa por debajo del hallado en áreas proximales. Es posible que la mayor dificultad en sortear las sucesivas bifurcaciones del nervio ciático haya afectado al número total de axones que lleguen a la periferia. Es posible también que el mayor tiempo de supervivencia del animal (un mes más respecto al estudio de las ramas nerviosas), para asegurar que los axones regenerantes tuviesen la oportunidad de alcanzar sus destinos más distales, haya contribuido a una mayor muerte neuronal. Es conocido que el número de células sensitivas que mueren tras una lesión aumenta con el paso de los meses. Así, algunas células que en el estudio de las ramas, realizado a dos meses de la sección-sutura, pudiesen estar en proceso de muerte, podrían estar ya ausentes al cabo de tres meses. En cualquier caso, el índice de reinervación en áreas distales se sitúa alrededor del *índice de regeneración* en nervios, calculado en un 55% al estudiar el tronco del nervio ciático, después de un tiempo similar de supervivencia, siendo plausible esta última explicación.

En estudios de sección del nervio ciático se han descrito porcentajes de pérdida de un 30% de las poblaciones ganglionares (Arvidsson et al., 1986; Himes y Tessler, 1989; Ygge, 1989; Verestergaard et al., 1997; Ljungberg et al., 1999). El estimar cifras de alrededor del 60% de reinervación en áreas distales en nuestros animales sería pues indicativo de que la mayoría de neuronas supervivientes regeneran. En aquellos trabajos, sin embargo, el nervio no se reparó, desconociéndose si por ello se detectó una pérdida neuronal de aquella magnitud. Desafortunadamente, no se han encontrado otros estudios específicos sobre cuantificación de muerte neuronal de neuronas sensitivas del nervio ciático después de una sección-sutura.

Estimación de la inervación perdida.

Si bien en el correspondiente apartado del estudio de la reinervación en ramas nerviosas los índices de inervación perdida global y relativa eran parecidos, en áreas distales no ocurre así.

De nuevo, el total de células marcadas únicamente con el primer trazador puede considerarse como orientativo de las células que, o bien no han regenerado, o lo han hecho hacia otros destinos. De todas formas, en áreas más distales es habitual encontrar un número considerable de células que no son alcanzadas por la inyección del segundo trazador, que no suele cubrir la totalidad del área marcada por el primero. Así, en

controles, el porcentaje de células marcadas únicamente con el primer trazador representa ya el $18.3 \pm 10.6\%$ del total de marcadas por éste. Cuando en el cálculo del índice global de inervación perdida se compara el total de células simple marcadas con el primer trazador de la extremidad experimental con el total de marcadas con el primer trazador de la extremidad control, el porcentaje es parecido (15.2%), sugiriendo de entrada una inervación perdida mínima. Sin embargo, al calcular el índice relativo de inervación perdida, comparando el total de marcadas sólo con el primer trazador con el total de marcadas con el mismo trazador en la extremidad experimental, el porcentaje asciende hasta el 43.8%, siendo significativamente distinto. De haber existido un importante “*fading*” en estos experimentos (ver más adelante), es posible que el número absoluto de células que contengan únicamente el primer trazador sea muy reducido, por lo que al referirlo a la extremidad control, en que el “*fading*” puede ser menor por cierta “recaptación”, se esté infraestimando notablemente la inervación perdida. Sin embargo, si el mismo número absoluto de células marcadas sólo con el primer trazador se compara con la muestra de células que permanecen marcadas con el mismo en la extremidad experimental, se obtiene un índice mayor que puede ser más representativo de la pérdida real de selectividad en aquella extremidad.

Asimismo, la inervación perdida en áreas distales es significativamente superior a la hallada en áreas proximales, probablemente debido a las dificultades de encontrar el camino correcto por parte de los axones, ante las sucesivas bifurcaciones nerviosas antes de alcanzar el destino final.

Para estos cálculos y los que se comentan a continuación se excluyó el caso R136, puesto que la inyección de DY en la extremidad control resultó deficiente, marcando un número muy inferior de células al habitual y no permitiendo usar ese valor como referencia de las neuronas halladas en la extremidad experimental de ese animal.

Para la demostración de la existencia de neuronas desviadas reinervando destinos distales se ha combinado el uso de técnicas basadas en trazadores fluorescentes con la detección de la alteración somatotópica en los núcleos de las neuronas de origen (Rende et al, 1991; Ito y Kudo, 1994; Popratiloff et al, 2001). Las conexiones incorrectas se demostraban también por la aparición de células doble marcadas después de aplicar trazadores en destinos distintos, demostrando la emisión de múltiples colaterales por parte de una sola neurona (Henning y Dietrichs, 1994; Ito y Kudo, 1994). No obstante, son precisos estudios a largo plazo para verificar la progresiva desaparición de las neuronas desviadas a favor de la reinervación selectiva, tal como se ha sugerido en el sistema visual en peces (Becker y Cook, 1988), en las motoneuronas del nervio facial (Ito y Kudo, 1994) y del nervio ciático en la rata (Henning y Dietrichs, 1994).

No hemos encontrado estudios de doble marcaje en que se evalúe específicamente el desvío y la falta de regeneración en áreas distales analizando las neuronas marcadas únicamente con un trazador aplicado inicialmente para marcar la población original, como proponemos en el presente trabajo.

Estimación de la regeneración selectiva.

Recordando el modelo teórico, la forma directa de objetivar el número de neuronas que han regenerado selectivamente se basaría en la cuantificación de aquellas que presentan ambos trazadores, el aplicado al principio y el aplicado después de la regeneración en la misma localización (FBDY). En áreas proximales esta consideración se veía afectada por el proceso de *recaptación*. Sin embargo, la recaptación del DY en

áreas distales es prácticamente nula, por lo que las células doble marcadas se pueden realmente considerar como células regenerantes que han vuelto a sus destinos originales, reinervándola selectivamente. Se descartaría, por tanto, que exista un número importante de células que, desviadas al área de estudio desde otras procedencias, presenten ambos trazadores.

Si el número de células doble marcadas se refiere al total de la población original en la rama experimental, identificada como la totalidad de las que presentan el primer trazador $(\text{FBDY}+\text{DY})_{\text{exp}}$, se obtiene un índice de *regeneración selectiva relativa* del 56%. Sin embargo, recordemos que este cociente puede estar afectado por un mayor “*fading*” en la extremidad experimental (ver apartado *Estimación de la reinervación detectable* en la sección 5.3.1 de regeneración en ramas nerviosas). Asimismo, si existiese cierto número de células ganglionares que hubiesen muerto, este porcentaje de selectividad podría estar siendo referido solamente a neuronas supervivientes, resultando mayor al real. Para neutralizar este efecto, puede ser oportuno comparar estas células doble marcadas a las de la extremidad control, como se contempla en el índice de *regeneración selectiva global*, situado alrededor del 22% en estos experimentos.

La regeneración selectiva en áreas distales es notablemente inferior a la detectada en áreas proximales. Si en aquéllas más de la mitad de los axones parecían reinervar sus destinos previos, aquí no parece alcanzar la cuarta parte de la población original. Este dato es complementario al alto grado de inervación perdida cuantificado anteriormente, y apoya la hipótesis de que las sucesivas bifurcaciones del nervio dificultan el hallar el camino correcto.

Si bien no se han encontrado estudios que analicen la reinervación sensitiva distal, existen algunos trabajos basados en técnicas de doble marcaje en que se evalúa la reinervación selectiva motora, aplicando un trazador al principio para marcar la población original y uno al final, en la misma localización, para marcar la población regenerante. Para ello se han ensayado diferentes combinaciones en diferentes sistemas. Así, el DY se ha combinado con HRP (Wigston y Kennedy, 1987) o FB (Hendry et al, 1986; Rende et al, 1991), mientras que otros han probado el FB con FG o DiI (Popratiloff et al, 2001). Así, se describe una cierta tendencia de las neuronas a reinervar sus destinos previos con una selectividad que oscilaría entre el 52% en el globo ocular (Hendry et al, 1986) y el 30-69% en la musculatura de la extremidad inferior (Wigston y Kennedy, 1987; Rende et al, 1991). Sin embargo, los músculos estudiados en los trabajos referenciados se hallaban en zonas más proximales de la extremidad, pudiendo por ello presentar un mayor grado de reinervación selectiva que la cuantificada en las falanges distales. Por otro lado, por las propias características del globo ocular, la comparación con los resultados de regeneración en los dedos puede resultar inadecuada.

Por otra parte, en los experimentos aquí presentados llamaba también la atención la significativa diferencia en el grado de regeneración selectiva entre el ganglio L4 (14-43%) y el ganglio L5 (44-71%), diferencia que no se reproducía en los controles (77-85%). Estas diferencias podían ser atribuibles a una mayor selectividad en la reinervación por parte de las neuronas pertenecientes a L5 respecto a las de L4, quizás por su posición en los fascículos del nervio, que podían quedar mejor situadas en el momento de la sutura, y regenerar mejor hacia sus destinos previos. Otra posibilidad, aunque remota, era que existiese otra fuente de inervación no determinada, cuyas terminaciones se situasen en un territorio adyacente y que, después de la lesión del nervio ciático, extendiese sus colaterales hacia el territorio denervado, captando el primer trazador y, más tarde, el segundo. Con el fin de dilucidar esta cuestión se diseñó

el experimento comentado en el apartado ‘*Mayor selectividad de las neuronas de L5 para regenerar vs. persistencia de otras fuentes de inervación intactas*’.

No se han encontrado estudios previos en que se analice explícitamente la posible diferencia en la capacidad regenerativa de ganglios distintos.

Estimación del “fading” del primer trazador.

Las consideraciones sobre “*fading*” en el apartado de reinervación de ramas nerviosas son también válidas aquí. En áreas distales, además, al no afectarse los índices por la posible recaptación, éstos son más aproximados. En cualquier caso, no existen diferencias significativas en cuanto al grado de “*fading*” entre unos experimentos y otros, aunque aquí el tiempo de supervivencia fue de un mes más.

Cabe suponer que esta pérdida de marcaje sea únicamente debida al paso de los meses, y, por tanto, homogénea en todas las poblaciones del nervio, de manera que las neuronas que permanecen visibles representen una muestra aleatoria del total de las originales. En tal caso, las estimaciones de regeneración y selectividad se ajustarían a los reales.

El análisis explícito del “*fading*” del primer trazador aplicado se ha realizado en pocos estudios. Así, se confirmaba que aproximadamente un 25% de la población marcada con HRP desaparecía en un plazo de 50 días, mientras que la población de DY permanecía o incluso aumentaba en un mismo estudio (Wigston y Kennedy, 1987). Por el contrario, otros trabajos argumentan que la “*recaptación*” puede implicar más bien un aumento de la población de neuronas que presente el primer trazador (Rende et al, 1991), con una mayor repercusión en los resultados.

Estimaciones de colateralización.

En estos experimentos se había aplicado FG tanto en el nervio femoral como en el nervio musculocutáneo. Para discernir entre las neuronas de los dedos que probablemente viajaban a través de uno u otro era preciso recordar los resultados comentados en el apartado 5.1.2, correspondiente a la distribución de los nervios en los ganglios así como su participación en la inervación de los dedos. Allí se había descrito la eliminación de las aferentes de L4 tras la resección del nervio femoral, añadida a la del nervio ciático. Por otro lado, las aferentes del nervio musculocutáneo nunca aparecieron doble marcadas en ese ganglio, sugiriendo que no participaban en la inervación de los dedos de los pies. Por tanto, en este estudio de colateralización, las células marcadas en L4 con FG y con los trazadores aplicados en los pies se atribuyeron al nervio femoral. Por otro lado, la inexistencia de neuronas del nervio femoral en L5 nos permitió atribuir al nervio musculocutáneo las neuronas que presentaban FG en ese ganglio.

Nervio femoral

Estudios precedentes habían descrito la expansión de terminaciones procedentes del nervio safeno hacia territorios adyacentes denervados tras la lesión del nervio ciático (Kinnman y Aldskogius, 1986; Wiesenfeld-Hallin et al, 1989; Kinnman et al, 1992). Sin embargo, solamente en tres de los seis casos estudiados aquí se encontró representación del femoral en neuronas únicamente marcadas con el segundo trazador, sugestivas de células que, sin pertenecer originalmente a la zona, habían llegado a ella a través de otros nervios tras la lesión del nervio ciático. En consecuencia, esta representación

solamente se limitaba a un 5.7% sobre la totalidad de la inervación del dedo en el mejor de los casos, no habiendo diferencias respecto a los controles, por lo que es difícil suponer que posibles colaterales procedentes del nervio femoral, que estudios precedentes han demostrado que inerva las partes más proximales del dedo de estudio (Wiesenfeld-Hallin et al, 1989), puedan estar ejerciendo una verdadera compensación tras una eventual denervación del ciático.

Nervio musculocutáneo

Solamente se apreció representación del nervio musculocutáneo en tres de los seis casos experimentales y, en todos los casos, las células que podían pertenecer a este nervio se hallaban también marcadas con el primer trazador. Ello nos sugiere que estas terminaciones estaban ya presentes antes de iniciar la lesión del nervio ciático. Un solo caso presentó otras tres neuronas en que aparecían únicamente el segundo de los trazadores aplicados en los dedos y el aplicado en el nervio, siendo potencialmente atribuibles a colateralización desde el nervio musculocutáneo.

Un solo caso presentó representación del nervio tanto en la extremidad experimental como la control, mientras que en los experimentos de inervación de los dedos se describía una representación constante en todos los casos. Esta discrepancia puede explicarse porque en aquellos experimentos se exploraba globalmente la participación de esta fuente de inervación en el conjunto de dedos laterales o mediales, sin particularizar en un dedo en particular. Podría ocurrir, por tanto, que la participación concreta en el dedo 3 fuese inconstante. En cualquier caso, la representación máxima de este nervio fue del 4% sobre el total de la inervación del dedo, por lo que también es cuestionable su posible papel compensador en casos de denervación.

Debe tenerse en cuenta que el periodo total de estudio fue de tres meses y que la pronta reinervación del territorio a través del propio nervio ciático puede hacer infravalorar la capacidad real de colateralización por parte de estos nervios adyacentes en caso de una denervación perdurable en el tiempo. Son precisos pues nuevos trabajos que evalúen el impacto de los nuevos nervios descritos en la compensación del territorio del nervio ciático cuando este último no pueda regenerar. De hecho, están descritas importantes remodelaciones en la médula espinal tras deaferentizaciones crónicas (Markus et al, 1984; Molander et al, 1988; Wilson y Kitchener 1996; Doubell et al, 1997; Mannion et al, 1998), pero existen menos referencias a los cambios periféricos.

Por otra parte, estudios en humanos confirman la recuperación de parte de la sensibilidad en los límites de los territorios denervados, atribuibles a la expansión de las terminaciones de los nervios que permanecen intactos (Aszmann et al, 1996; Healy et al, 1996). Por tanto, cabe confiar en el futuro en el papel que pueden desempeñar las fuentes de inervación vecinas.

Mayor selectividad de las neuronas de L5 para regenerar vs. persistencia de otras fuentes de inervación intactas.

Cabe recordar que después de tres meses de una sección-sutura unilateral del nervio ciático éste fue reseado bilateralmente, tras lo que se aplicó FB en el dedo 3 y cinco días más tarde se procedió a la resección del resto de nervios y a la inyección de todos los dedos con FG. Tanto las extremidades experimentales como las controles presentaron de 1 a 3 neuronas con FB en L5 o L6 en todos los casos, aunque sin diferencias significativas. En ningún caso estas neuronas, que no viajan a través del nervio ciático, pueden explicar el alto porcentaje de doble marcaje en L5 hallado en los

estudios experimentales, pues las fuentes alternativas a este nervio demuestran aquí tener una representatividad escasa. Probablemente estas neuronas provenían del nervio musculocutáneo, nervio que fue seccionado días más tarde a la inyección de FB. La práctica ausencia de neuronas marcadas con FG confirma la eliminación de la inervación adyacente tras la sucesiva resección de los nervios femoral y musculocutáneo, si bien la presencia de 2 células en L6 en un animal, deja la puerta abierta a hallar en un futuro alguna otra colateral que, en cualquier caso, sería de poca relevancia global en la regeneración de las falanges distales de los dedos de los pies.

Como ya se señaló anteriormente, no se han encontrado referencias a estudios que aborden específicamente esta cuestión.

5.4 Consideraciones sobre conteo neuronal.

En cada sección obtenida por microtomía, toda neurona que se encuentre en la zona limítrofe del corte puede fragmentarse, apareciendo en varios cortes sucesivos, dependiendo de su diámetro y del grosor de las secciones. Por tanto, el conteo de las neuronas que aparecen en una muestra de los cortes y su multiplicación por el número total de ellos, resulta en una sobreestimación del número total de células. El problema es aplicable a cualquier unidad de conteo (neuronas, núcleos, nucléolos...), si bien cuanto menor sea el diámetro de esa unidad y mayor sea el grosor del corte, se minimiza el error. Clásicamente se habían descrito fórmulas para compensar este efecto, basadas únicamente en los diámetros de la unidad de conteo y los grosores del corte (Abercrombie, 1946) o que también consideraban el diámetro de las partículas invisibles (Floderus, 1944; Königsmark, 1970). Algunos autores no tienen en cuenta estas fuentes de sesgo (Popratiloff et al, 2001), mientras que se pueden encontrar trabajos en que se han corregido los datos con estos métodos, especialmente el de Abercrombie, hasta fechas recientes (Rath y Green, 1991; Molander y Aldskogius, 1992; Brushart, 1993; Al-Majed et al, 2000). Sin embargo, según los datos de algunos estudios de calibración de los diferentes métodos estereológicos, basados en simulaciones por ordenador (Smolen et al, 1983) o en el conteo del número real de neuronas (Coggeshall, 1990), los métodos clásicos de corrección podían infraestimar o sobreestimar los verdaderos resultados.

A mediados de los años ochenta se describió el *disector* (Sterio, 1984), un nuevo método estereológico sobre el que se basan la mayoría de estudios estrictamente cuantitativos sobre el sistema nervioso. Se combina con el principio del *fraccionador* (Gundersen, 1986), basado en cuantificar únicamente en una franja del total del grosor del corte, así como en una fracción del área total de la sección, y, a su vez, en una muestra del total de secciones. En la actualidad, estas fracciones se escogen aleatoriamente a través de un ordenador adaptado a un microcator, acoplado a su vez al microscopio, que permite el consiguiente desplazamiento de la sección. En principio, se había considerado que este método neutralizaba los sesgos de los métodos clásicos. Sin embargo, nuevos estudios sugieren que, debido a problemas histológicos, el disector incluye otras fuentes de error que impiden una estimación precisa del número total de neuronas (Hatton y Von Bartheld, 1999), y algunos autores proponen muestreos aleatorios no sistemáticos (Dorph-Petersen et al, 2000). Al iniciar nuestros experimentos en 1995 no disponíamos de la tecnología adecuada para aplicar el disector óptico a microscopía de fluorescencia ultravioleta y las secciones no se hallaban

orientadas aleatoriamente, con tal de facilitar su reconstrucción tridimensional y la comparabilidad entre los diferentes grupos de nuestros experimentos. Además, al estudiar las neuronas que proyectaban a los dedos de los pies, el número de células por sección era muy reducido y variable. Por otro lado, tanto las neuronas de los dedos de los pies como, fundamentalmente, las neuronas sensitivas de los nervios no se disponían aleatoriamente dentro del ganglio. En cualquier caso, las primeras descripciones técnicas para el uso del disector en secciones procedentes de criomicrotomía son muy recientes (Messina et al, 2000). En secciones obtenidas por congelación es preciso averiguar el grosor final real, para corregir el encogimiento que sufren, sin asumir que coincide con el grosor de corte en el microtomo. Cabe destacar, sin embargo, que la población estimada mediante el disector óptico de las motoneuronas del nervio ciático tras el marcaje con FB (Messina et al, 2000) es casi el doble de la encontrada en nuestros animales, ya antes de realizar ninguna corrección, así como el doble también de la descrita por otros autores (Swett et al, 1986). Puesto que nuestras cifras corresponden a los contajes en una muestra de los cortes, el multiplicarlas por el número de cortes genera una segura sobreestimación del número real de células por los problemas de fraccionamiento de las neuronas descritos anteriormente. Por tanto, no conseguimos explicar por qué las primeras estimaciones basadas en el disector óptico son aún mayores.

Para una mayor precisión de las cifras aportadas, se procedió, en el estudio de la distribución de las neuronas aferentes de las falanges distales de los dedos de los pies, a calcular un índice de corrección empírico averiguando el número total real de neuronas a partir de contabilizar cada célula una sola vez, identificándola en sucesivas superposiciones de los cortes. Cuando el número real se refería al número obtenido tras los contajes en una muestra de secciones, se obtenía el factor de corrección deseado. Procedimientos comparables se habían utilizado previamente (Coggeshall y Chung, 1984; Pover y Coggeshall, 1991). Sin embargo, la obtención del factor de corrección requiere una laboriosa reconstrucción de la población neuronal. Además, el factor de corrección obtenido en el estudio de los dedos no puede aplicarse a las cifras correspondientes al marcaje del nervio ciático, pues el grosor de los cortes es distinto. Por añadidura, la reconstrucción de perfiles después del marcaje directo del nervio resultaría aún más dificultosa si tenemos en cuenta que se obtienen unas 70 secciones por ganglio, que pueden visualizarse hasta 150 neuronas por corte, y que éstas a su vez deberían identificarse en las sucesivas secciones adyacentes. Cabría verificar asimismo que no hubiese ninguna alteración selectiva en los experimentos de regeneración, siendo oportuno obtener un factor de corrección de cada población neuronal, puesto que las características de los somas de las poblaciones regenerantes respecto a las que no han regenerado podrían ser distintas (Crews y Wigston, 1990), aunque algunos autores no detectan diferencias sustanciales (Pollin et al, 1991).

Considerando, sin embargo, que se han detectado problemas de marcaje asociados al uso de los trazadores fluorescentes estudiados –“*recaptación*”, “*fading*”, etc- que interfieren seriamente la interpretación de los resultados y la obtención de índices más precisos de regeneración, reduciéndolos a datos semi-cuantitativos, se ha decidido reservar la búsqueda de una corrección empírica y la puesta en marcha de la metodología estereológica del disector óptico al hallazgo de una combinación de trazadores más satisfactoria. En su día, será posible aplicar una corrección a los resultados de los contajes simples aquí presentados para contrarrestar los sesgos que contienen.

6. CONCLUSIONES

1. Existe una distribución somatotópica de las neuronas aferentes que proyectan a la extremidad posterior en los ganglios lumbares, claramente visualizable al estudiar las poblaciones que proyectan a los principales nervios de la extremidad posterior -femoral y ciático- y más solapada en las poblaciones que proyectan a áreas más distales.
2. El solapamiento en las poblaciones neuronales que proyectan distalmente dificulta el estudio de la reinervación selectiva por medio de la simple observación de alteraciones en el patrón anatómico, por lo que es preciso un estudio complementario con trazadores fluorescentes.
3. El uso de DY como primer trazador y de FB como segundo puede constituirse en una combinación para estudios de doble marcaje en que el primero se utilice para marcar la población original de un área y el segundo la población regenerante. En cualquier caso, deberá tenerse en cuenta cierto grado de desaparición del DY.
4. La aplicación de DY mediante inyección en ramas cutáneas permite marcar la práctica totalidad de fibras del nervio con una mínima agresión. El segundo marcaje mediante FB, aplicado en una cápsula, nos asegurará que la totalidad de las fibras que hayan regenerado a la rama de estudio contactarán con éste trazador, marcando la población regenerante.
5. La aplicación de DY en las falanges distales de los dedos de los pies, seguida de la aplicación de una mayor cantidad de FB con el objeto de cubrir en lo posible el área marcada con el primer trazador, se propone como modelo para el estudio de la reinervación selectiva en áreas distales sensitivas.
6. Las falanges distales de los dedos de los pies están inervadas por un pequeño número de aferentes procedentes de los nervios femoral y musculocutáneo, lo cual debe tenerse en cuenta en estudios de regeneración del nervio ciático.
7. En el uso de la técnica de doble marcaje en regeneración tiene lugar un proceso aquí llamado "*recaptación*", según el cual el primer trazador permanece en el área de aplicación, estando disponible para ser captado por nuevos axones regenerantes procedentes de otros nervios y desviados a la zona de estudio, confundiendo la identificación de la población original, si bien la magnitud del proceso es limitada si se usa DY o FG como primer trazador.
8. La mayoría de las neuronas regeneran y escogen la rama adecuada en la primera bifurcación del nervio ciático.
9. Aunque el número de neuronas que alcanzan las áreas distales después de la reparación de una sección nerviosa es más de la mitad del inicial, sólo una cuarta parte aproximadamente de la población original vuelve a sus destinos previos.

10. Las neuronas de L5 tienen mayor selectividad que las de L4 para reinervar los destinos más distales, por lo que es preciso estudiar la totalidad de los ganglios para calcular la selectividad global del nervio ciático.
11. En el modelo propuesto, los nervios intactos adyacentes tienen un papel limitado en la inervación compensatoria del territorio denervado si el nervio lesionado se repara.

7. BIBLIOGRAFÍA

- Abercrombie M, (1946), Estimation of nuclear population from microtome sections, *Anat Rec*, 94: 239-247.
- Aldskogius A, Thomander L, (1986), Selective reinnervation of somatotopically appropriate muscles after facial nerve transection and regeneration in the neonatal rat. *Brain Res*, 375: 126-134.
- Aldskogius A, Molander CE, Persson J, Thomander L, (1987), Specific and non-specific regeneration of motor axons after sciatic nerve injury and repair in the rat, *J Neurol Sci*, 80: 249-257.
- Al-Majed A, Neumann CM, Brushart TM, Gordon T, (2000), Brief electrical stimulation promotes the speed and accuracy of motor axonal regeneration, *J Neurosci*, 20: 2602-2608.
- Arvidsson J, Ygge J, Grant G, (1986), Cell loss in lumbar dorsal root ganglia and transganglionic degeneration after sciatic nerve resection in the rat, *Brain Res*, 373: 15-21.
- Aszmann OC, Muse V, Dellon AL, (1996), Evidence in support of collateral sprouting after sensory nerve resection. *Ann Plastic Surg*, 37: 520-525.
- Baranowsky AP, Priestley JV, McMahon SB, (1994), The consequence of delayed versus immediate nerve repair on the properties of regenerating sensory nerve fibres in the adult rat, *Neurosci Lett*, 168: 197-200.
- Bayer SA, Altman J, Russo RJ, Dai XF, Simmons JA, (1991), Cell migration in the rat embryonic neocortex, *J Comp Neurol*, 307: 499-516.
- Bayer SA, Triarhou LC, Thomas JD, Ghetti B, (1994), Correlated quantitative studies of the neostriatum, nucleus accumbens substantia nigra and ventral tegmental area in normal and weaver mutant mice, *J Neurosci*, 14: 6901-6910.
- Becker DL, Cook JE, (1988), Divergent axon collaterals in the regenerating goldfish optic tract: a fluorescence double-label study, *Development*, 104: 317-320.
- Brown MC, Hardman VJ, (1987), A reassessment of the accuracy of reinnervation by motoneurons following crushing or freezing of the sciatic of lumbar spinal nerves of rats, *Brain*, 110: 695-705.
- Brushart TM, (1990), Preferential motor reinnervation: a sequential double-labeling study, *Restor Neurol Neurosci*, 1: 281-287.
- Brushart TM, (1993), Motor axons preferentially reinnervate motor pathways, *J Neurosci*, 13: 2730-2738.
- Brushart TM, Seiler WA, (1987), Selective reinnervation of distal motor stumps by peripheral motor axons, *Exp Neurol*, 97: 289-300.
- Coggeshall RE, Chung K, (1984), The determination of an empirical correction factor to deal with the problem of nucleolar splitting in neuronal counts, *J Neurosci Methods*, 10: 149-155.
- Coggeshall, RE, La Forte R, Klein DM, (1990), Calibration of methods for determining numbers of dorsal root ganglion cells, *J Neurosci Meth*, 35: 187-194.
- Corner MA, Veltman WA, Baker RE, Van de Nes J, (1978) Topography of cutaneous spinal ganglion cells in the frog (*Rana esculenta*), *Brain Res*, 156: 151-156.
- Crews LL, Wigston DJ, (1990), The dependence of motoneurons on their target muscle during postnatal development of the mouse, *J Neurosci*, 10: 1643-1653.

- Divac I, Mogensen J, (1990), Long-term retrograde labelling of neurons, *Brain Res*, 524: 339-341.
- Dong K, Qu T, Ahmed FA, Zhang L, Yamada K, Guison NG, Miller M, Yamadori T, (1996), Fluoro-Green and Fluoro-Red: two new fluorescent retrograde tracers with a number of unique properties, *Brain Res*, 736: 61-67.
- Dorph-Petersen KA, Gundersen HJ, Jensen EB, (2000), Non-uniform systematic sampling in stereology, *J Microsc*, 200: 148-157.
- Doubell TP, Mannion RJ, Woolf CJ, (1997), Intact sciatic myelinated primary afferent terminals collaterally sprout in the adult rat dorsal horn following section of a neighbouring peripheral nerve, *J Comp Neurol*, 380: 95-104.
- Fawcett JW, Keynes RJ, (1990), Peripheral nerve regeneration, *Annu Rev Neurosci*, 13: 43-60.
- Filiano JJ, Choi JC, Kinney HC, (1990), Candidate cell populations for respiratory chemosensitive fields in the human infant medulla, *J Comp Neurol*, 293: 448-465.
- Floderus S, (1944), Untersuchungen über den Bau der Menschlichen Hypophyse mit besonderer Berücksichtigung der qualitativen mikromorphologischen Verhältnisse, *Acta Pathol Microbiol Scand*, 53: 1-276.
- Fritsch B, Sonntag R, (1991), Sequential double labelling with different fluorescent dyes coupled to dextran amines as a tool to estimate the accuracy of tracer application and of regeneration, *J Neurosci Methods*, 39: 9-17.
- Funnel WRJ, Maysinger D, Cuello AC, (1990), Three-dimensional reconstruction and quantitative evaluation of devascularizing cortical lesions in the rat, *J Neurosci Meth*, 35: 147-156.
- Garrett TW, McBride RL, Williams JK, Feringa ER, (1991), Fluoro-Gold's toxicity makes it inferior to True Blue for long-term studies of dorsal root ganglion neurones and motoneurons, *Neurosci Lett*, 128: 137-139.
- Grant G, (1993), Projection of primary sensory neurons studied by transganglionic methods: somatotopy and target-related organization, *Brain Res Bull*, 30: 199-208.
- Greene CE, (1963), *Anatomy of the rat*, New York and London. Hafner Publishing Company.
- Gundersen HJ, (1986), Stereology of arbitrary particles. A review of unbiased number and size estimators and the presentation of some new ones, in memory of William R. Thomson, *J Microsc*, 143: 3-45.
- Harsh C, Archibald SJ, Madison RD, (1991), Double labelling of saphenous nerve neurone pools: a model for determining the accuracy of axon regeneration at the single neuron level, *J Neurosci Methods*, 39: 123-129.
- Hatton WJ, Von Bartheld CS, (1999), Analysis of cell death in the trochlear nucleus of the chick embryo: calibration of the optical disector counting method reveals systematic bias, *J Comp Neurol*, 409: 169-186.
- Healy C, LeQuesne PM, Lynn B, (1996), Collateral sprouting of cutaneous nerves in man, *Brain*, 119: 2063-2072.
- Henning R, Dietrichs E, (1994), Transient reinnervation of antagonistic muscles by the same motoneuron, *Exp Neurol*, 130: 331-336.
- Hendry LA, Hill CE, Watters DJ, (1986), Long-term retention of Fast Blue in sympathetic neurones after axotomy and regeneration-demonstration of incorrect reconnections, *Brain Res*, 376: 292-298.
- Himes BT, Tessler A, (1989), Death of some dorsal root ganglion neurons and plasticity of others following sciatic nerve section in adult and neonatal rats, *J Comp Neurol*, 284: 215-230.

- Honig MG, Hume IR, (1989), DiI and DiO: versatile fluorescent dyes for neuronal labelling and pathway tracing, *Trends Neurosci*, 12: 333-335, 340-341.
- Horikawa K, Powell EW, (1986), Comparison of techniques for retrograde labelling using the rat's facial nucleus, *J Neurosci Methods*, 17: 287-296.
- Huang XF, Törk I, Paxinos G, (1993), Dorsal motor nucleus of the vagus nerve: a cyto- and chemoarchitectonic study in the human, *J Comp Neurol*, 330: 150-182.
- Innocenti GM, Clarke S, Kraftsik R, (1986), Interchange of callosal and association projections in the developing visual cortex, *J Neurosci*, 6: 1384-1409.
- Ishihara A, Roy RR, Edgerton RV, (1995), Succinate dehydrogenase activity and soma size of motoneurons innervating different portions of the rat tibialis anterior, *Neuroscience*, 68: 813-822.
- Ito M, Kudo M, (1994), Reinnervation by axon collaterals from single facial motoneurons to multiple muscle targets following axotomy in the adult guinea pig, *Acta Anat*, 151: 124-30.
- Kausz M, Rethely M, (1985), Lamellar arrangement of neuronal somata in the dorsal root ganglion in the cat, *Somatotens Res*, 2: 193-204.
- Kinnman E, Aldskogius H, (1986), Collateral sprouting of sensory axons in the glabrous skin of the hindpaw after chronic sciatic nerve lesion in adult and neonatal rats: a morphological study, *Brain Res*, 377: 73-82.
- Kinnman E, Aldskogius H, Johansson O, Wiesenfeld-Hallin Z, (1992), Collateral reinnervation and expansive regenerative reinnervation by sensory axons into "foreign" denervated skin: an immunohistochemical study in the rat, *Brain Res*, 91: 61-72.
- Koltzenburg M, Wall PD, McMahon SB, (1999), Does the right side know what the left is doing?, *Trends in Neurosci*, 22: 122-127.
- Königsmark BW, (1970), Methods for the counting of neurones. In W.J.H. Nauta and S.O.E. Ebbeson (eds): *Contemporary Research Methods in Neuroanatomy*. Berlin: Springer-Verlag, 315-338.
- Ljungberg C, Novikov L, Kellerth JO, Ebendal T, Wiberg W, (1999), The neurotrophins NGF and NT-3 reduce sensory neuronal loss in adult rat after peripheral nerve lesion, *Neurosci Lett*, 262:29-32.
- Madison RD, Archibald SM, Brushart TM, (1996), Reinnervation accuracy of the rat femoral nerve by motor and sensory neurons, *J Neurosci*, 16: 5698-703.
- Mannion RJ, Doubell HG, Gill G, Woolf CJ, (1998), Deafferentation is insufficient to induce sprouting of A-fibre central terminals in the rat dorsal horn, *J Comp Neurol*, 393: 135-144.
- Manzano G, McComas AJ, (1988), Longitudinal structure and innervation of two mammalian hindlimb muscles, *Muscle & Nerve*, 11:1115-1122.
- Markus H, Pomeranz B, Krushelnycky D, (1984), Spread of saphenous somatotopic projection map in the spinal cord and hypersensitivity of the foot after chronic sciatic denervation in the adult rat, *Brain Res*, 296: 27-39.
- Mc Ritchie DA, Törk I, (1993), The internal organisation of the human solitary nucleus, *Brain Res Bull*, 31: 171-193.
- Messina A, Sangster CLC, Morrison WA, Galea MP, (2000), Requirements for obtaining unbiased estimates of neuronal numbers in frozen sections, *J Neurosci Meth*, 97, 133-137.
- Mirnic K, Koerber HR, (1985), Lamellar arrangement of neuronal somata in the dorsal root ganglion in the cat, *Somatotens Res*, 2: 193-204.

- Molander C, Aldskogius H, (1992), Directional specificity of regenerating neurons after peripheral nerve crush or transection and epineural suture. A sequential double-labelling study in the rat, *J Restor Neurol Neurosci*, 4: 339-344.
- Molander C, Grant G, (1985), Cutaneous projections from the rat hindlimb foot to the substantia gelatinosa of the spinal cord studied by transganglionic transport of WGA-HRP conjugate, *J Comp Neurol*, 237: 476-484.
- Molander C, Kinnman E, Aldskogius H, (1988), Expansion of spinal cord primary sensory afferent projection following combined sciatic nerve resection and saphenous nerve crush: a horseradish peroxidase study in the adult rat, *J Comp Neurol*, 276: 436-441.
- Naumann T, Härtig W, Frotscher M, (2000), Retrograde tracing with fluoro-gold: different methods of tracer detection at the ultrastructural level and neurodegenerative changes of back-filled neurons in long-term studies, *J Neurosci Meth*, 103: 11-21.
- Novikova L, Novikov L, Kellerth O, (1997), Persistent neuronal labelling by retrograde fluorescent tracers: a comparison between Fast Blue, Fluoro-Gold and various dextran amines, *J Neurosci Meth*, 74: 9-15.
- Onifer SM, White LA, Whittemore SR, Holets VR, (1993), In vitro labeling strategies for identifying primary neural tissue and a neuronal cell line after transplantation in the CNS, *Cell Transplantation*, 2: 131-149.
- Pachter BR, Eberstein A, (1991), Nerve sprouting and endplate growth induced in normal muscle by contralateral partial denervation of rat plantaris, *Brain Res*, 560: 311-314.
- Peyronnard JM, Charron LF, Lavoie J, Messier JP, (1986a), Motor, sympathetic and sensory innervation of rat skeletal muscles, *Brain Res*, 373: 288-302.
- Peyronnard JM, Charron LF, Lavoie J, Messier JP, (1986b), Differences in Horseradish Peroxidase labelling of sensory, motor and sympathetic neurons following chronic axotomy of the rat sural nerve, *Brain Res*, 364: 137-150.
- Peyronnard JM, Charron LF, Lavoie J, Messier JP, Bergouignan FX, (1988), A comparative study of the effects of chronic axotomy, crush lesion and re-anastomosis of the rat sural nerve on horseradish peroxidase labelling of primary sensory neurons, *Brain Res*, 443: 295-309.
- Peyronnard JM, Charron LF, Lavoie J, Messier JP, (1990), Three dimensional computer-aided analysis of the intraganglionic topography of primary muscle afferents neurones in the rat, *Anat Rec*, 227: 405-417.
- Pollin MM, McHanwell S, Slater CR, (1991), The effect of age and motor neurone death following axotomy in the mouse, *Development*, 112: 83-89.
- Pover CM, Coggeshall RE, (1991), Verification of the disector method for counting neurons, with comments on the empirical method, *Anat Rec*, 231: 573-578.
- Popratiloff AS, Neiss WF, Skouras E, Streppel M, Guntinas-Lichius O, Angelov D, (2001), Evaluation of muscle re-innervation employing pre- and post-axotomy injections of fluorescent retrograde tracers, *Brain Res Bull*, 54: 115-123.
- Prats-Galino A, Costa Llobet C, Arroyo Guijarro J, Ruano Gil D, (1988), The facial motor nucleus of the dog I. Cytoarchitectonic subdivisions and cytology. *Acta Anat*, 132: 276-279.
- Rath S, Green CS, (1991), Selectivity of distal reinnervation of regenerating mixed motor and sensory nerve fibres across muscle grafts in rats, *Br J Plast Surg*, 44: 215-228.
- Rende M, Granato A, Lo Monaco M, Zelano G, Toesca A, (1991), Accuracy of reinnervation by peripheral nerve axons regenerating across a 10-mm gap within an impermeable chamber, *Exp Neurol*, 111: 332-339.

- Richmond FJR, Gladdy R, Creasy JL, Kitamura S, Smits E, Thomson DB, (1994), Efficacy of seven retrograde tracers, compared in multiple-labelling studies of feline motoneurons, *J Neurosci Methods*, 53: 35-46.
- Shenaq SM, Mendelow M, Shenaq HM, Spira M, (1989), Evaluation of axonal specificity of the regenerating rat sciatic nerve using a fluorescent labeling technique, *Microsurgery*, 10: 210-213.
- Shortland P, Woolf CJ, (1993), Morphology and somatotopy of the central arborizations of rapidly adapting glabrous skin afferents in the rat lumbar spinal cord, *J Comp Neurol*, 329: 491-511.
- Smolen AJ, Wright LL, Cunningham TJ, (1983), Neurones numbers in the superior cervical sympathetic ganglion of the rat: a critical comparison of methods for cell counting, *J Neurocytol*, 12: 739-750.
- Sterio DC, (1984), The unbiased estimation of number and sizes of arbitrary particles using the disector, *J Microsc*, 134: 127-136.
- St. John PA, (1991), Toxicity of "DiI" for embryonic rat motoneurons and sensory neurons in vitro, *Life Sci*, 49: 2013-2021.
- Summer A, (1990), Aberrant reinnervation, *Muscle & Nerve*, 13: 801-803.
- Suzuki G, Ochi M, Shu N, Uchio Y, Matsuura Y, (1998), Sensory neurons regenerate more dominantly than motoneurons during the initial stage of the regenerating process after peripheral axotomy, *Neuroreport*, 9: 3487-3492.
- Swett JE., Woolf CJ, (1985), The somatotopic organization of primary afferent terminals in the superficial laminae of the dorsal horn of the rat spinal cord, *J Comp Neurol*, 231: 66-77.
- Swett JE, Wikholm RP, Blanks RH, Swett AL, Conley LE, (1986), Motoneurons of the rat sciatic nerve, *Exp Neurol*, 93: 227-252.
- Taylor DCM, Pierau FK, Schmid H, (1983), The use of fluorescent tracers in the peripheral sensory nervous system, *J Neurosci Meth*, 8: 211-224.
- Thomas PK, (1989), Focal nerve injury: guidance factors during axonal regeneration, *Muscle & Nerve*, 12: 796-802.
- Verestergaard S, Tandrup T, Jakobsen J, (1997), Effect of permanent axotomy on number and volume of dorsal root ganglion cell bodies, *J Comp Neurol*, 388: 307-312.
- Weiss ML, Cobbett P, (1992), Intravenous injection of Evans Blue labels magnocellular neuroendocrine cells of the rat supraoptic nucleus *in situ* after dissociation, *Neuroscience*, 48: 383-395.
- Wessels WJT, (1990), Evidence for a rostrocaudal organization in dorsal root ganglia during development as demonstrated by intra-uterine WGA-HRP injections into the hindlimb of rat fetuses, *Dev Brain Res*, 54: 273-281.
- Wessels WJT, Marani E, (1993), A rostrocaudal somatotopic organization in the brachial dorsal root ganglia of neonatal rats, *Clin Neurol Neurosurg*, 95: S3-S11.
- Wessels WJT, Feirabend HKP, Marani E, (1994), The rostrocaudal organisation in the dorsal root ganglia of the rat: a consequence of plexus formation?, *Anat Embryol*, 190: 1-11.
- Wiesenfeld-Hallin Z, Kinnam E, Aldskogius H, (1989), Expansion of innervation territory by afferents involved in plasma extravasation after nerve regeneration in adult and neonatal rats, *Exp Brain Res*, 75: 88-96.
- Wigston DJ, Kennedy PR, (1987), Selective reinnervation of transplanted muscles by their original motoneurons in the axolotl, *J Neurosci*, 7: 1857-1865.
- Wilson P, Kitchener PD, (1996), Plasticity of cutaneous primary afferent projections to the spinal dorsal horn, *Prog Neurobiol*, 48:105-129.

- Yamaguchi H, Ochi M, Mori R, Ryoke K, Yamamoto S, Iwata A, Uchio Y, (1999), Unilateral sciatic nerve injury stimulates contralateral nerve regeneration, *Neuroreport*, 10, 1359-1362.
- Ygge J, (1989), Neuronal loss in lumbar dorsal root ganglia after proximal compared to distal sciatic nerve resection: a quantitative study in the rat, *Brain Res*, 478:193-195.

APÉNDICE.

Artículos en los que se basa la Tesis.

- Artículo 1.- Puigdellívol-Sánchez A, Prats-Galino A, Ruano-Gil D, Molander C, (1998a), Sciatic and femoral nerve sensory neurones occupy different regions of the L4 dorsal root ganglion in the adult rat, *Neuroci Lett*, 251: 169-172.
- Artículo 2.- Prats-Galino A, Puigdellívol-Sánchez A, Ruano-Gil D, Molander C, (1999), The representations of hindlimb digits in the rat dorsal root ganglia, *J Comp Neurol*, 408:137-145.
- Artículo 3.- Puigdellívol-Sánchez A, Prats-Galino A, Forcada-Calvet P, Molander C, (2000a), The relative contribution of femoral and sciatic nerve branches to the sensory innervation of the hindlimb digits in the rat, *Anat Rec*, 260:180-188.
- Artículo 4.- Puigdellívol-Sánchez A, Prats-Galino A, Ruano-Gil D, Molander C, (2000b), Fast Blue and Diamidino Yellow as retrograde tracers in peripheral nerves: efficacy of combined nerve injection and capsule application to transected nerves in the adult rat, *J Neuroci Methods*, 95:103-110.
- Artículo 5.- Puigdellívol-Sánchez A, Prats-Galino A, Ruano-Gil D, Molander C, (1998b), Efficacy of the fluorescent dyes Fast Blue, Fluoro-Gold and Diamidino Yellow for retrograde tracing to dorsal root ganglia after subcutaneous injection, *J Neuroci Methods*, 86:7-16.
- Artículo 6.- Puigdellívol-Sánchez A, Valero-Cabré A, Prats-Galino A, Navarro X, Molander C. On the use of fast blue, fluoro-gold and diamidino yellow for retrograde tracing after peripheral nerve injury: uptake, fading, dye interactions, and toxicity. (enviado a *J Neurosci Methods*)

