



Cinvestav

CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y DE ESTUDIOS AVANZADOS  
DEL INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL

UNIDAD ZACATENCO

DEPARTAMENTO DE FISIOLÓGÍA, BIOFÍSICA Y NEUROCIENCIAS

**“Caracterización histológica y de los potenciales de acción  
compuestos de las raíces y columnas dorsales de la médula  
espinal de la rata”**

TESIS

Que presenta

M. V. Z. FERNANDO HERNÁNDEZ MORGADO

Para obtener el grado de

**MAESTRO EN CIENCIAS**

EN LA ESPECIALIDAD DE

**NEUROBIOLOGÍA CELULAR Y MOLECULAR**

Director de Tesis:

Tutor: Dr. Ismael Jiménez Estrada

Ciudad de México

Agosto, 2023

# AGRADECIMIENTOS

A mi maravillosa madre, Guadalupe M., quien incansablemente ha trabajado por el bienestar y desarrollo de sus hijos, inculcando valores y exhortando a siempre ser buenas personas.

A mis hermanos Ximena y David quienes siempre me han apoyado; los quiero mucho.

A mi padre Fernando H., quien ha fomentado en mí las virtudes del estudio y el ejercicio.

A Miguel R., por apoyarme y ayudarme a crecer en todo ámbito.

Al Dr. Ismael Jiménez Estrada de quién he aprendido un sinfín de conocimientos los cuales han formado parte importante de mi desarrollo personal y profesional.

A mis compañeros del laboratorio Jatsiri, Lalo, Grecia y Cindy que me ayudaron en la adquisición de conocimientos y habilidades esenciales durante mi formación, agradezco su invaluable amistad.

A mis palomas, Ghidorah y Paloma por siempre ponerme feliz.

Al departamento de Fisiología, biofísica y Neurociencias, por brindarme los espacios y materiales necesarios para poder realizar el presente trabajo de investigación.

A mis compañeras de maestría Deni, Fernanda, Karla y Sahian por ser tan unidas y siempre trabajar como un verdadero equipo durante las materias y nuestros proyectos.

A mis asesores los Drs. Rodolfo Delgado y Jorge Quevedo por sus clases, así como recomendaciones a la hora de realizar mi proyecto de maestría.

Al CONAHCYT por la beca otorgada durante la realización del presente proyecto con numero de registro 1148220.

# Índice

<b>AGRADECIMIENTOS</b> .....	2
<b>RESUMEN</b> .....	4
<b>ABSTRACT</b> .....	5
<b>Introducción</b> .....	6
<b>Potencial de acción compuesto (PAC)</b> .....	11
<b>Glía mielinizante.</b> .....	17
<b>G ratio</b> .....	21
<b>HIPOTESIS.</b> .....	22
<b>OBJETIVO GENERAL</b> .....	23
<b>OBJETIVOS PARTICULARES</b> .....	23
<b>MÉTODOS</b> .....	24
<b>Disección de la Raíz dorsal L5 y de las Columnas dorsales L5</b> .....	25
<i>Histología de las columnas y raíces dorsales</i> .....	32
<b>ANALISIS DE RESULTADOS</b> .....	33
<b>Registros electrofisiológicos</b> .....	33
<b>Histología:</b> .....	34
<b>RESULTADOS</b> .....	37
<b>Peso corporal</b> .....	37
<b>Características histológicas de los axones aferentes en las raíces y cuernos dorsales de la médula espinal.</b> .....	38
<b>Registros electrofisiológicos</b> .....	44
<b>Discusión</b> .....	48
<b>Conclusiones</b> .....	53
<b>Perspectivas del estudio</b> .....	54
<b>Bibliografía</b> .....	55

## RESUMEN

El Sistema Nervioso de los mamíferos se ha dividido en 3 partes, por un lado se encuentra el Sistema Nervioso Central (SNC), constituido por el cerebro y la médula espinal, por otro el Sistema Nervioso Periférico (SNP), compuesto por nervios y ganglios periféricos, y finalmente por el Sistema Nervioso Autónomo (SNA). Los estímulos externos son percibidos por los receptores sensoriales, quienes los transducen a potenciales de acción, mismos que son transmitidos por las fibras aferentes hacia la médula espinal y a su vez hacia la corteza cerebral, en donde son integrados y procesados, dando lugar a respuestas conductuales y/o fisiológicas, de acuerdo al tipo y magnitud del estímulo. Cabe mencionar que el grado de comunicación entre el SNP y el SNC depende en gran medida de que las vías aferentes periféricas que llegan a la médula espinal a través de las raíces dorsales, así como de aquellas que ascienden de la médula espinal hacia el cerebro (por las columnas dorsales), presenten características histológicas y funcionales bien definidas. Por lo que el presente estudio tiene como objetivo el establecer las características histológicas (diámetro y grosor de la mielina) y electrofisiológicas (potencial de acción compuesto; PAC) de los grupos de axones (mielinizados) presentes en las raíces dorsales y en las columnas dorsales de la médula espinal de la rata.

Nuestros resultados muestran que los axones mielinizados de las columnas dorsales de la médula espinal poseen un diámetro relativamente homogéneo (con poca dispersión), pero menor grado de mielinización que los axones presentes en las raíces dorsales, en donde al parecer se encuentran dos poblaciones de axones de distinto diámetro y con diferente grosor de mielina, teniendo la población de axones de mayor diámetro un mayor grosor de mielina, mientras que la población más fina, menor grosor de mielina.

Por otra parte, el potencial de acción compuesto generado en las columnas dorsales muestra dos componentes, uno con bajo umbral de activación, latencia de aparición breve, poca duración y de gran amplitud, mientras que el segundo componente, a pesar de que presenta un umbral de activación semejante al del primer componente, muestra mayor latencia de aparición, mayor duración y es de menor amplitud. En cambio, en las raíces dorsales se genera un PAC que contiene un solo componente, de bajo umbral de activación, de latencia y duración breves y de gran amplitud.

De nuestros resultados podemos concluir que las raíces dorsales contienen axones aferentes mielinizados de bajo umbral de activación y de latencia de activación breve, cuyo PAC corresponde a la activación de una población de axones aferentes de origen cutáneo (grupos A alfa o beta) y muscular (grupo I). En cambio, los axones presentes en las columnas dorsales de la médula espinal, a pesar de presentar características histológicas homogéneas, su PAC presenta dos componentes, los cuales al parecer resultan de la activación de dos grupos de axones con características electrofisiológicas diferentes.

## **ABSTRACT**

The Nervous System of mammals has been divided into 3 parts, on one hand is the Central Nervous System (CNS), made up of the brain and spinal cord, and on the other the Peripheral Nervous System (PNS), made up of nerves and ganglia and finally by the Autonomic Nervous System (ANS). External stimuli are perceived by sensory receptors, who transduce them into action potentials, which are transmitted by afferent fibers to the spinal cord and turn into the cerebral cortex, where they are integrated and processed, giving rise to behavioral and/or physiological responses., according to the type and magnitude of the stimulus. It should be mentioned that the degree of communication between the PNS and the CNS depends to a large extent on the peripheral afferent pathways that reach the spinal cord through the dorsal roots, as well as those that ascend from the spinal cord to the brain (by the dorsal columns). Therefore, the present study aims to establish the histological (diameter and thickness of myelin) and electrophysiological (compound action potential; CAP) characteristics of the groups of (myelinated) axons present in the dorsal roots and in the dorsal columns of the rat spinal cord.

Our results show that the myelinated axons of the dorsal columns of the spinal cord have a relatively homogeneous diameter (with little scattering), but a lower degree of myelination than the axons present in the dorsal roots, where two populations of axons appear to be found with different diameter and different thickness of myelin, the population of axons with the largest diameter having a greater thickness of myelin, while the thinnest population, less thickness of myelin.

On the other hand, the compound action potential generated in the dorsal columns shows two components, one with a low activation threshold, short onset latency, short duration, and high amplitude, while the second component, despite having a low threshold activation like that of the first component, it shows greater onset latency, longer duration, and is of lesser amplitude. In contrast, a PAC containing a single component, with a low activation threshold, short latency and duration, and high amplitude is generated in the dorsal roots.

From our results we can conclude that the dorsal roots contain myelinated afferent axons with a low activation threshold and a short activation latency, whose PAC corresponds to the activation of a population of afferent axons of cutaneous origin (Aalpha or beta groups) and muscle origin (I group). In contrast, the axons present in the dorsal columns of the spinal cord, despite presenting homogeneous histological characteristics, their PAC presents two components, which apparently result from the activation of two groups of axons with different electrophysiological characteristics.

## Introducción

La percepción del entorno externo e interno de los animales se lleva a cabo mediante la activación de receptores sensoriales exteroceptivos (por ejemplo: al tacto, presión, temperatura, pilosos, entre otros, localizados principalmente en la piel) y propioceptivos (por ejemplo, husos musculares y órganos tendinosos de Golgi, localizados en los músculos esqueléticos) los cuales transfieren los estímulos ambientales, de una modalidad en particular, a potenciales de acción que se transmiten por los axones nerviosos periféricos hacia la médula espinal y el encéfalo, en donde activan vías, circuitos y/o redes neuronales que reciben e integran la información sensorial y elaboran la respuesta o conducta del animal, ello de acuerdo al tipo de estímulo sensorial percibido (Boron, 2017).

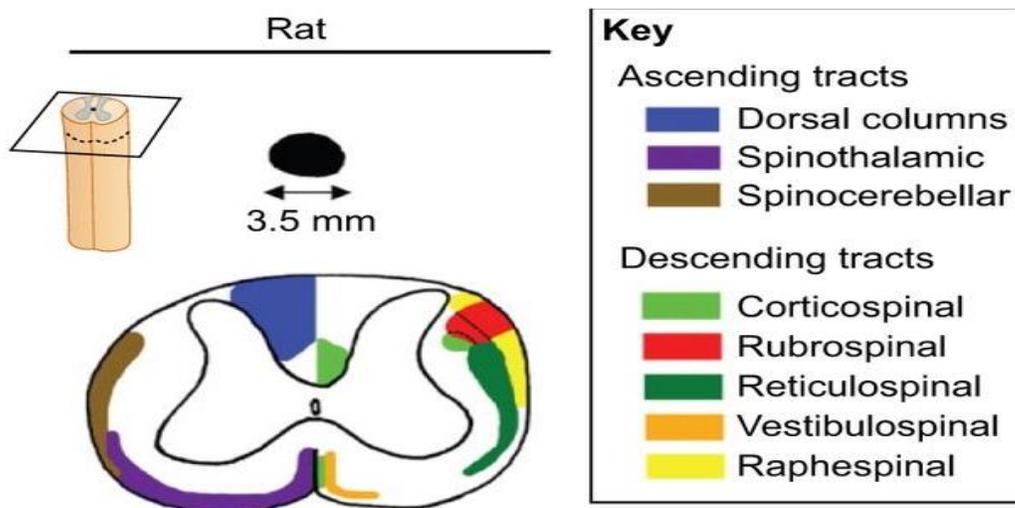
Entre los receptores cutáneos, se incluyen a los corpúsculos de Meissner y los folículos pilosos, quienes participan en la mecanorecepción del tacto fino y la discriminación entre dos puntos. También se encuentran los corpúsculos de Pacini, los cuales se encargan de discriminar la presión profunda y la vibración cutánea. Así mismo, se presentan receptores de temperatura (frío o calor), así como otros receptores que perciben distintos tipos de estímulos ambientales

(Abraira y Ginty, 2013). Por otra parte, en el sentido de propiocepción definido como “percepción inconsciente de los movimientos y de la posición del cuerpo, independiente de la visión” (Rae, 2022), participan los husos musculares y los órganos tendinosos de Golgi, que en conjunto, son denominados propioceptores y que son activados por cambios en la longitud muscular o el desarrollo de fuerza durante una contracción muscular, respectivamente, participando en el control motor fino y en la información transmitida sobre la posición axial del individuo respecto al espacio (Campero, 2018).

De acuerdo con la intensidad del estímulo que reciben, los receptores sensoriales pueden generar patrones de potenciales de acción, que constituyen “códigos de frecuencia”, siendo éstos considerados como la información sensorial que se transmite a lo largo de los axones o fibras nerviosas aferentes contenidas en los nervios periféricos, los que alcanzan la médula espinal a través de las raíces dorsales (ver más adelante).

En un corte transversal, la médula espinal exhibe dos zonas claramente diferenciadas estructuralmente entre sí, una de ellas es la Substancia gris, la cual contiene primordialmente cuerpos neuronales y glia (astroglía, microglía y oligodendroglía) y se divide en dos columnas

laterales, separadas por la comisura intermedia que contiene el conducto del epéndimo en la parte media, confiriéndole una forma de “mariposa”. A su vez, la sustancia gris se subdivide en astas anteriores y astas posteriores (también denominadas cuernos dorsales y ventrales, respectivamente) y la zona intermedia (Carpenter, 1992). En cambio, la sustancia blanca rodea a la sustancia gris y se divide en 3 segmentos: anterior o dorsal, posterior o ventral y las laterales, en donde se encuentran axones aferentes y tractos ascendentes y descendentes, en regiones particulares de la Sustancia blanca (Barret, et al., 2013) (Figura 1).



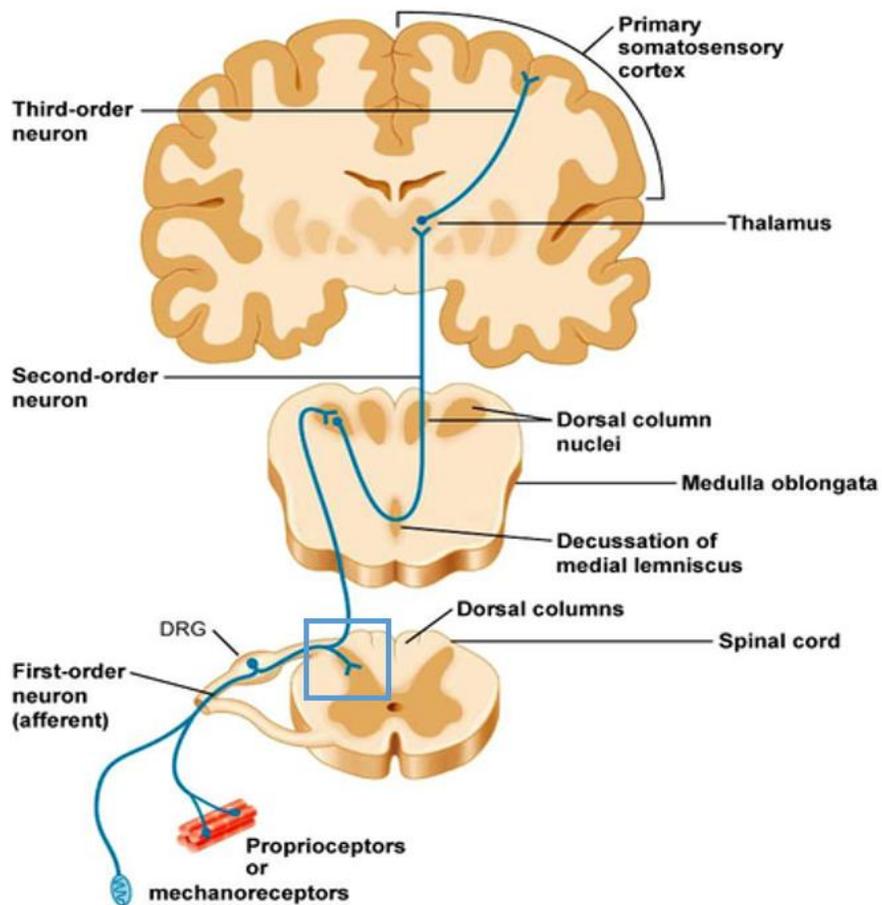
**Figura 1.** Diagrama de los tractos ascendentes y descendentes de la médula espinal de la rata.

Longitudinalmente, la médula espinal se divide en 5 secciones: cervical, torácica, lumbar, sacra y coccígea, las que a su vez se subdividen en segmentos. En la rata, cada segmento espinal presenta pares de nervios espinales o raíces dorsales y ventrales: 8 pares cervicales, 12 torácicos, 6 lumbares, 5 sacros y 1 coccígeo, las cuales surgen del canal vertebral a través de los forámenes intervertebrales (Konig y Liebich, 2011). Las raíces dorsales o posteriores están conformadas por axones o fibras nerviosas aferentes, cutáneas y musculares, cuyo soma se localiza en los ganglios espinales (Hill, 2012) mientras que los axones de las raíces ventrales surgen de las motoneuronas espinales y proyectan a los músculos periféricos a través de los nervios motores.

Al ingresar a la médula espinal, las fibras aferentes se bifurcan en dos ramas principales, una de ellas se introduce al funículo dorsal de la Substancia blanca, constituyendo los fascículos Cuneatus y Gracilis, también conocidos como columnas dorsales (Hill, 2012), en donde se dividen en una rama secundaria rostral y otra caudal (Figura 2). La rama caudal tiene una longitud relativamente corta (se extiende a solo dos o tres segmentos caudales; Smith y Bennett, 1987), mientras que la rama rostral se extiende hasta alcanzar la región ventro-posterior lateral del tálamo (Afifi y Bergman, 2021), en donde hacen contacto sináptico con

neuronas de segundo orden, cuyos axones proyectan a la corteza somatosensorial primaria del cerebro, en donde activan columnas de neuronas corticales, así como vías, circuitos o redes neuronales que procesan la información sensorial y elaboran la o las respuestas o conductas motoras que sean apropiadas al tipo de estímulo sensorial que percibe el animal (Boron, 2017) (Figura 2).

Por otro lado, la segunda rama de los axones aferentes, ingresa a la sustancia gris de la médula espinal en donde realiza contactos sinápticos en regiones del cuerno dorsal o de la parte media de la sustancia gris, con neuronas de primer orden, también conocidas como interneuronas. En el caso de las aferentes de origen muscular, éstas hacen sinapsis con interneuronas (en la región media de la médula espinal) y con neuronas motoras (motoneuronas) localizadas en el cuerno ventral de la médula espinal. La acción sináptica de las fibras aferentes a su vez, activa circuitos o grupos neuronales que generan patrones de respuesta estereotipados a los estímulos sensoriales, o generan cambios en la postura o en el movimiento de los animales (Thirumalai y Jha, 2022) (Figura 2).



**Figura 2.** Trayectoria de los axones aferentes desde la médula espinal hasta el tálamo.

## Potencial de acción compuesto (PAC)

A principios del siglo pasado, Erlanger y Gasser (1924) fueron capaces de registrar el potencial de acción de un nervio periférico y cómo éste cambiaba de amplitud a medida que se incrementaba la intensidad del estímulo eléctrico que lo generaba. Tal observación condujo a que se

determinarán las propiedades electrofisiológicas de los tipos de axones presentes en los nervios, en donde la velocidad de conducción del potencial de acción depende del diámetro, así como del grado de mielinización del axón nervioso, permitiendo de tal manera construir una clasificación de las fibras nerviosas en los nervios sensoriales y/o motores, la cual que se muestra en la siguiente tabla:

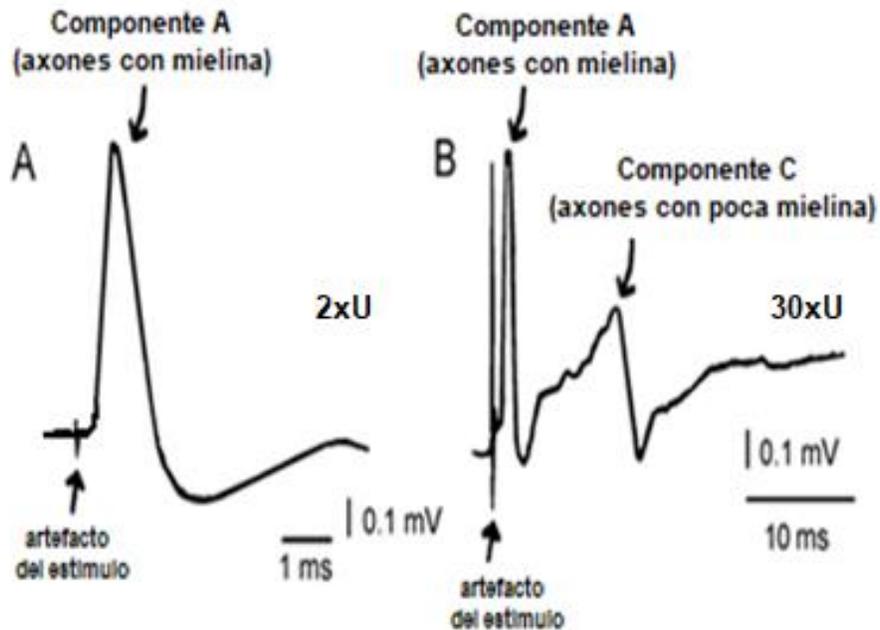
Tipo de axón	Diámetro (micrómetros)	Velocidad de conducción (m/s)	Tipo de receptor del que se originan
A $\alpha$ (I)	13–22	70–120	Husos musculares, órganos tendinosos de Golgi, tacto.
A $\beta$ (II)	8–13	40–70	Tacto, husos musculares.
A $\gamma$ (II)	4–8	15–40	Tacto, presión.
A $\delta$ (III)	1–4	5–15	Dolor, tacto, presión, temperatura.
B (IV)	1-3	3-14	Receptores preganglionares.
C (IV)	0.1-1	0.2-2	Dolor, tacto, presión profunda, temperatura.

**Tabla 1.** Características de los tipos de fibras aferentes primarias presentes en los nervios periféricos (entre paréntesis se indica la nomenclatura de los tipos de axones de receptores de origen muscular) . Modificada de Ganong, Fisiología Médica, Edición 24, Ed. McGraw Hill Interamericana.

El registro del PAC en los nervios periféricos ha sido utilizado para la caracterización de las propiedades electrofisiológicas de la población de axones mielinizados y poco o no mielinizados, presentes en los mismos, ante una amplia gama de condiciones experimentales o de variadas enfermedades neurológicas (Melo, et al. 2022).

Conviene señalar que el PAC es la respuesta sincronizada de la población de axones presentes en los nervios periféricos o en los tractos ascendentes o descendentes de la médula espinal y se produce por la aplicación de pulsos eléctricos de corta duración (0.5 ms) y de intensidad variable. Dependiendo de la intensidad del estímulo, se pueden activar distintos grupos de axones en los nervios periféricos de origen cutáneo, partiendo de los más excitables (de bajo umbral de activación, entre 1 y 5 veces el umbral de activación de las fibras más excitables) que corresponderían a los axones de mayor diámetro transversal, mielinizados y velocidad de conducción alta ( $A\alpha$  y  $A\beta$ ; Tabla 1; componente A en la Figura 3A) y que transmiten información sensorial no nociva, hasta los menos excitables ( $A\delta$  y C; Tabla 1; componente C en la Fig. 3), los cuales corresponden a axones de gran umbral de activación, menor diámetro transversal, poco o no mielinizados y de velocidad de conducción lenta, que llevan información

de estímulos nocivos. Entre los parámetros que caracterizan a los PAC se encuentran los siguientes: 1) Amplitud y área, los cuales son representativos del número de axones excitados por el estímulo eléctrico, ante una intensidad determinada del estímulo. Tanto la amplitud como el área aumentan de magnitud a medida que se incrementa la intensidad del estímulo. Cabe señalar que a medida que se incrementa la intensidad del estímulo aplicado pueden aparecer varios componentes en el registro del PAC, los cuales podrían corresponder a la activación de distintos grupos de axones de mayor umbral y menor velocidad de conducción (ver Figura 3B). 2) Latencia de inicio y al pico del PAC, es el tiempo que tarda en registrarse el inicio del potencial de acción compuesto desde el sitio donde se aplicó el estímulo eléctrico y la latencia al pico hace referencia al tiempo en que se alcanza la máxima amplitud del PAC y que correspondería al tiempo promedio de activación de los axones en el nervio (Parker, 2018). 3) Duración del PAC. Este parámetro es considerado como un índice del grado de sincronía de la activación del conjunto de axones en los nervios aferentes.



**Figura 3.** Componentes del potencial de acción compuesto del nervio cutáneo sural (SU) evocados por dos intensidades de estimulación eléctrica: A) 2 veces umbral (2xU) y B) 30xU. Note la diferencia en la latencia de aparición y la amplitud de ambos componentes del PAC (Segura et al., 2001).

A pesar del amplio uso de nervios periféricos para la caracterización del PAC, existen muy pocos reportes experimentales en los que se analicen las características electrofisiológicas e histológicas de la población de axones presentes en las columnas dorsales de la médula espinal. Velumian y colaboradores (2011, 2013), mediante el uso de una cámara de registro con brecha de sacarosa y con distintas maniobras experimentales (por ejemplo, disminuyendo la temperatura del líquido

cefaloraquídeo artificial en el baño) demuestran que el PAC de toda la médula espinal o de cuadrantes de ella, presenta dos componentes de distinto umbral de activación y diferente latencia de aparición (Figura 4), los cuales evidencian la activación de distintos grupos de axones nerviosos con características electrofisiológicas diferentes (latencia, duración, velocidad de conducción y amplitud), y que posiblemente correspondan a la activación de axones de tractos ascendentes como descendentes, o de axones de neuronas propio-espinales (Velumian et al., 2011).

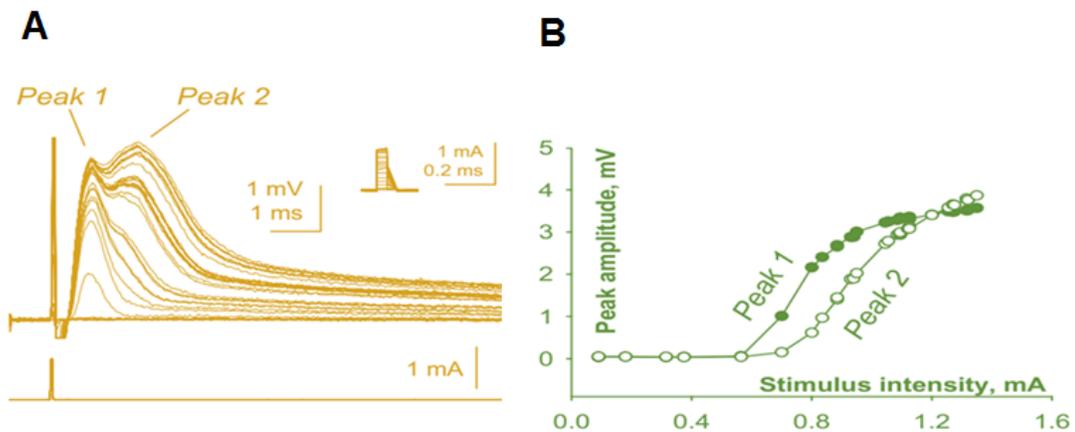


Figura 4. El PAC espinal presenta dos componentes de distinta latencia, los cuales evidencian la activación de grupos de axones nerviosos, posiblemente de tractos ascendentes como descendentes, con velocidades de conducción diferentes (Velumian et al., 2011).

## **Glía mielinizante.**

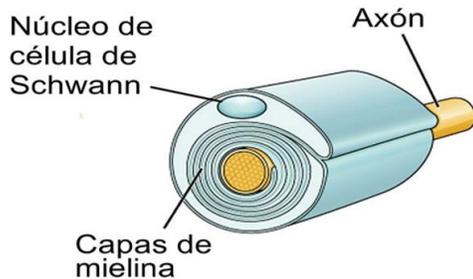
Para que la propagación de la información sensorial no nociva de la periferia a regiones centrales del Sistema Nervioso pueda ser llevada a cabo de manera eficiente es imprescindible que los axones nerviosos sean capaces de transmitir apropiadamente los potenciales de acción, tanto a nivel periférico como central. Para ello, es necesario que los axones mantengan una estrecha relación con las células gliales mielinizantes (células de Schwann en el SNP y oligodendrocitos en el SNC; Fontenas y Kucenas, 2018).

La función principal las células gliales mielinizantes es la de formar capas o vainas de mielina alrededor de los axones, las cuales proporcionan un mayor aislamiento eléctrico a la membrana axonal, permitiendo que el potencial de acción se propague de manera saltatoria (de un nodo de Ranvier y otro). Lo anterior confiere a los axones periféricos y centrales la propiedad de conducir con mayor velocidad el potencial de acción. Aparte de lo anterior, las células gliales mielinizantes proveen de soporte trófico a las neuronas, así como favorecen el crecimiento de los axones en periodos críticos del desarrollo posnatal, remielinizan los axones que hayan sufrido algún

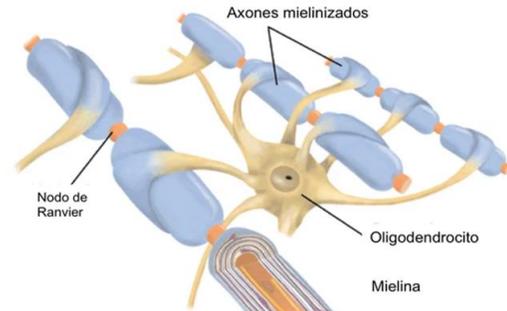
proceso traumático e inclusive secretan factores quimiotácticos esenciales para la organización del SNP y SNC (Jessen y Mirsky, 2005).

Si bien, el SNP y el SNC poseen un gran porcentaje de axones mielinizados, la mielinización de tales axones no es producto del mismo tipo de glía mielinizante. A nivel periférico, las células de Schwann son las encargadas de mielinizar los axones provenientes de los receptores sensoriales, mientras que los oligodendrocitos mielinizan los axones de los distintos tractos ascendentes y descendentes de la médula espinal. Las células de Schwann tienen como origen embriológico la cresta neural mientras que los oligodendrocitos surgen del tubo neural (Matoba et al., 2017). Una diferencia notoria de la capa de mielina entre el SNP y el SNC es el mecanismo con el que la glía mieliniza los axones, ya que los oligodendrocitos expanden múltiples procesos de membrana y envuelven varios segmentos axonales a la vez (Figura 5 B), mientras que las células de Schwann envuelven a un solo segmento del axón (Fontenas y Kucenas, 2018) (Figura 5A). Cabe señalar que se desconoce si ambas células gliales mielinizan de igual manera a los axones periféricos o centrales.

### A Células de Schwann

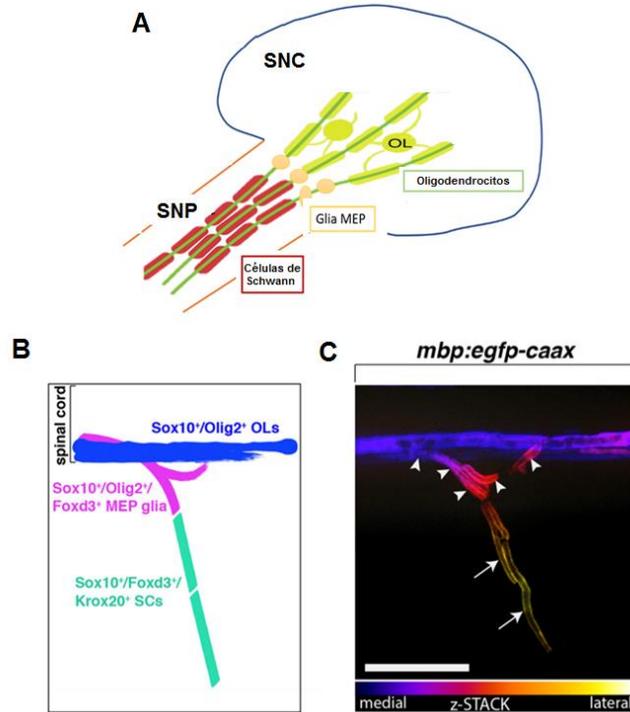


### B Oligodendroglía



**Figura 5.** Ilustraciones esquemáticas de la manera en que (A) las células de Schwann y (B) los oligodendrocitos, mielinizan los axones periféricos y centrales, respectivamente (Fontenas y Kucenas, 2018).

Por otra parte, conviene mencionar que las células de Schwann y los oligodendrocitos se encuentran segregados entre sí, esto es, se encuentran separados físicamente por un tercer tipo de glía mielinizante, denominada glía del punto de salida motora (cuyo nombre en inglés es: “motor exit point glia”, MEP) la cual se localiza en el punto de transición de la entrada o salida de los axones aferentes sensoriales y de los axones eferentes motores, respectivamente, cuya función radica en segregar los componentes gliales periféricos y centrales, manteniendo la integridad y función de la zona de transición del sistema nervioso (Fontenas y Kucenas, 2018)(Figura 5).



**Figura 6.** A) Diagrama que ilustra la disposición de los distintos tipos de células mielinizantes (células de Schwann -Sc-, Oligodendroglía -OL- y del punto de salida motora -MEP-) en la región de salida de los axones motores de la médula espinal. B) Diagrama que indica los marcadores de mielina que permiten identificar los 3 tipos de glía mielinizante. C) Microfotografía confocal mostrando los 3 tipos de glía mielinizante en la médula espinal (de Fontenas y Kucenas, 2018).

El hecho de que los axones aferentes periféricos sean mielinizados por las células de Schwann mientras que en la médula espinal lo sean por células oligodendrogiales, abre la posibilidad de caracterizar las características histológicas y electrofisiológicas de una población de

axones, tanto periféricos como centrales, que son mielinizados por dos clases diferentes de células gliales mielinizantes.

## **G ratio**

Es ampliamente aceptado que el grosor del envoltorio de mielina de los axones mantiene una estrecha relación lineal con el diámetro de los mismos axones, por lo que se ha establecido una proporción denominada G (“g ratio”), la cual es la relación entre el diámetro transversal interno del axón y el diámetro del axón con la capa de mielina (Figura 7). Por ejemplo, si el axón es amielínico o tienen muy poca mielina, el valor de la proporción G tiende a ser 1, mientras que los muy mielinizados su valor se encuentra entre 0.3 y 0.6. La proporción G óptima para los axones de nervios periféricos es de alrededor de 0.6, mientras que en distintas regiones del SNC se alcanzan valores entre 0.3 a 0.7 (Waxman y Bennett, 1972). Es conveniente señalar que en la actualidad se desconoce el valor de la proporción G para los axones de tractos ascendentes y descendentes, localizados en la sustancia blanca de la médula espinal.



Figura 7. Proporción G. Relación entre el diámetro interno del axón con respecto al diámetro externo

## PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

¿Se presentan diferencias en el grado de mielinización y el PAC de los axones aferentes en las raíces dorsales en comparación con los axones en las columnas dorsales?

## HIPOTESIS.

Los axones de las raíces dorsales poseen mayor diámetro y posiblemente mayor grado de mielinización que los axones de las columnas dorsales, por lo que ambas estructuras presentan diferencias en las características del Potencial de Acción Compuesto (PAC).

## **OBJETIVO GENERAL**

Determinar las características histológicas, así como del PAC de las columnas dorsales (SNC) y de las raíces dorsales (SNP) de la médula espinal en ratas macho de la cepa Wistar.

## **OBJETIVOS PARTICULARES**

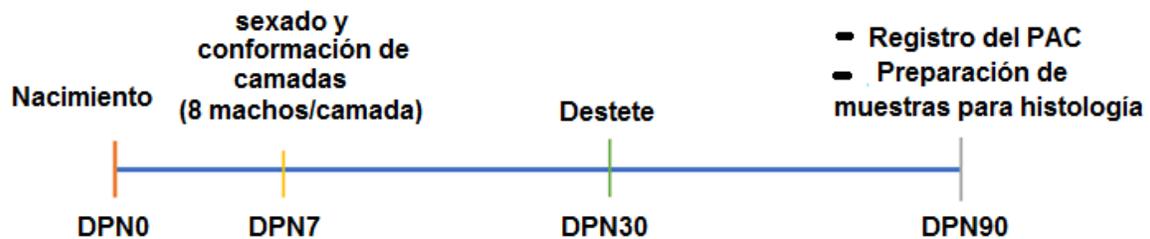
1. Registrar y evaluar el potencial de acción compuesto (amplitud, duración y área) de las columnas dorsales de las raíces dorsales de la médula espinal de ratas machos a los 90 días de edad posnatal.
2. Determinar las características histológicas (diámetro de los axones y grosor de la mielina) de las columnas dorsales y de las raíces dorsales de ratas machos a los 90 días de edad postnatal.
3. Determinar la proporción G de los axones de las columnas dorsales y de las raíces dorsales de la médula espinal de la rata macho.

## MÉTODOS

Los animales experimentales dispuestos para este proyecto fueron 32 ratas macho de la cepa Wistar, criadas en el bioterio general del CINVESTAV, IPN (UPEAL Protocolo 013-02). Todos los animales fueron alojados en cajas de acrílico (50 x 30 x 20 cm) que permitieron que los animales tuvieran un espacio suficiente para cada una de ellas. Las ratas se mantuvieron en un cuarto del área de experimentación del bioterio general, bajo condiciones de temperatura y humedad constante ( $22 \pm 2$  °C y  $40 \pm 1\%$ , respectivamente) y con un ciclo de luz/oscuridad de 12h (con las luces encendidas a las 8:00h). Asimismo, a los animales se les proveyó de alimento comercial (Formulab 5008; LabDiet, Framingham, MA, USA) y agua ad libitum.

Para asegurar que los animales experimentales fueran lo más homogéneos posible (en peso y edad), se obtuvieron de la cruce de ratas Wistar hembras primíparas en la fase de proestro tardío con machos sexualmente expertos. Quince días después del apareamiento, cada hembra fue alojada en una caja de acrílico individual (43 x 53 x 20 cm) hasta el día del parto. En el día posnatal 7 (DPN7), las crías resultantes sexadas y separadas para criar camadas de 8 machos cada una y a partir de esa edad fueron pesadas semanalmente hasta el día

del experimento. Cada una de las crías en las camadas fue marcada con un número en la cola (1-8) con tinta indeleble, ello con el objetivo de facilitar su identificación al momento de obtener su peso y de medir su talla (de la base de la cola a la nariz). A los 30 días de nacidas, las crías fueron destetadas y cada grupo de ellas fue alojada en cajas de acrílico (43 x 53 x 20 cm) hasta el día del experimento (DPN90) (Figura 8).



**Figura 8.** Diagrama del diseño experimental.

### **Diseción de la Raíz dorsal L5 y de las Columnas dorsales L5**

Tanto la médula espinal completa (entre los segmentos Lumbar 3 a Sacro 3 (L3-S3) como las raíces dorsales, fueron extraídas de la rata para la realización tanto de los registros electrofisiológicos como del análisis histológico, mediante los procedimientos quirúrgicos que se describen a continuación:

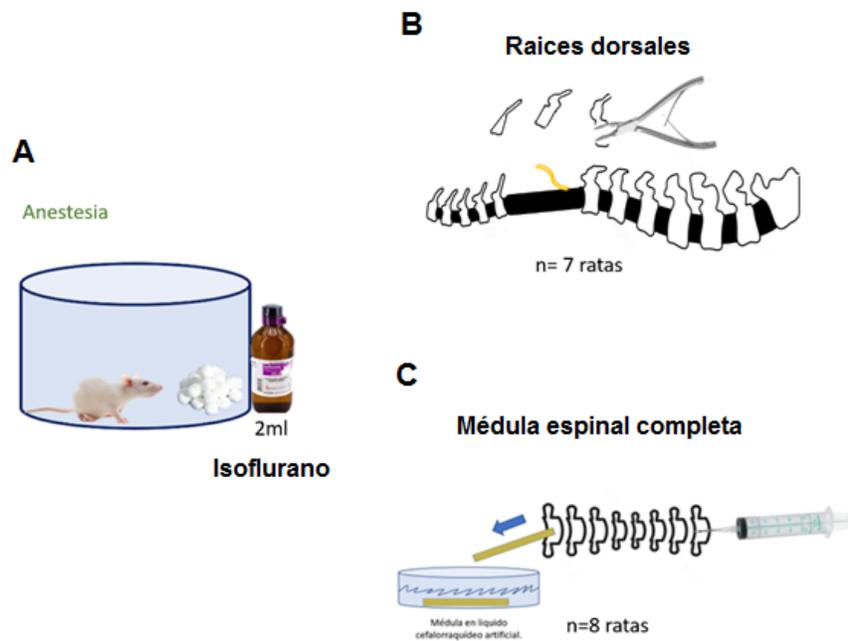
### Disección de las raíces dorsales.

Cada animal fue anestesiado por separado en un contenedor hermético, en donde se le colocó un algodón con IsoSol (isoflurano, USP. Figura 8A). Posteriormente, mediante disección de los músculos paravertebrales, se expusieron las vértebras lumbosacras (L3 a S2) y a nivel lumbar, se les practicó una laminectomía bilateral para exponer el canal espinal. Subsecuentemente y con pinzas de disección finas se localizó la raíz L5, la cual se aisló y se extrajo una porción de aproximadamente 1.5 a 2 cm de longitud (Figura 9B), la cual fue colocada en una caja de Petri con líquido cefalorraquídeo artificial, para después ser empleada para el registro electrofisiológico o bien, para el análisis histológico de la misma (ver más adelante).

### Disección de la médula espinal completa

Al igual que en la disección de las raíces dorsales, los animales fueron primero anestesiados con IsoSol, ya en plano quirúrgico se les practicó una sección a nivel cervical de la columna vertebral y otra a nivel sacro, con la ayuda de una tijera fuerte. Inmediatamente después, se introdujo en el orificio del canal espinal caudal un tubo de látex, conectado a una jeringa de 20 ml, que contenía líquido cefalorraquídeo artificial (NaCl

128 mM, KCl 3 mM, NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.5 mM, MgSO<sub>4</sub> 1 mM, NaHCO<sub>3</sub> 21 mM, glucosa 30 mM, diluidos en agua desionizada) y mediante presión negativa, provocó la expulsión de la médula espinal entre los segmentos L3 a S1, la cual se depositó en una tapa de una caja de Petri conteniendo líquido cefalorraquídeo artificial a temperatura ambiente (23-25 °C) (Figura 9C).



**Figura 9.** Diagrama de los procedimientos quirúrgicos empleados para la extracción de la raíz dorsal del quinto segmento lumbar (L5) y de la médula espinal completa de la rata. (A) Anestesia, (B) Extracción de la raíz dorsal L5 y C) Extracción de la médula espinal entera.

Subsecuentemente, la médula espinal extraída fue preparada tanto para el registro electrofisiológico o para el análisis histológico de las columnas dorsales.

### Disección de las raíces dorsales

Para obtener las raíces dorsales, un grupo adicional de ratas (n=6) fueron anestesiadas con IsoSol (isoflurano, USP) y se les realizó una laminectomía bilateral para exponer la médula espinal. Posteriormente, se identificaron y separaron las raíces dorsales y sólo se extrajo un segmento de la raíz dorsal L5 (2 a 3 cm de longitud). Posteriormente, los animales fueron sacrificados con una sobredosis de anestésico, aunado a una dislocación cervical (Figura 6C). Una vez extraída la raíz dorsal, ésta fue colocada en una cámara de registro y se utilizó el mismo sistema de estimulación y registro del PAC empleado para la médula espinal, descrito previamente (véanse párrafos previos).

### Registro electrofisiológico

Los segmentos torácico-lumbares de la médula espinal extraída o en su caso, las raíces dorsales disecadas, se colocaron en una cámara de registro llena de líquido cefalorraquídeo artificial, mantenido a

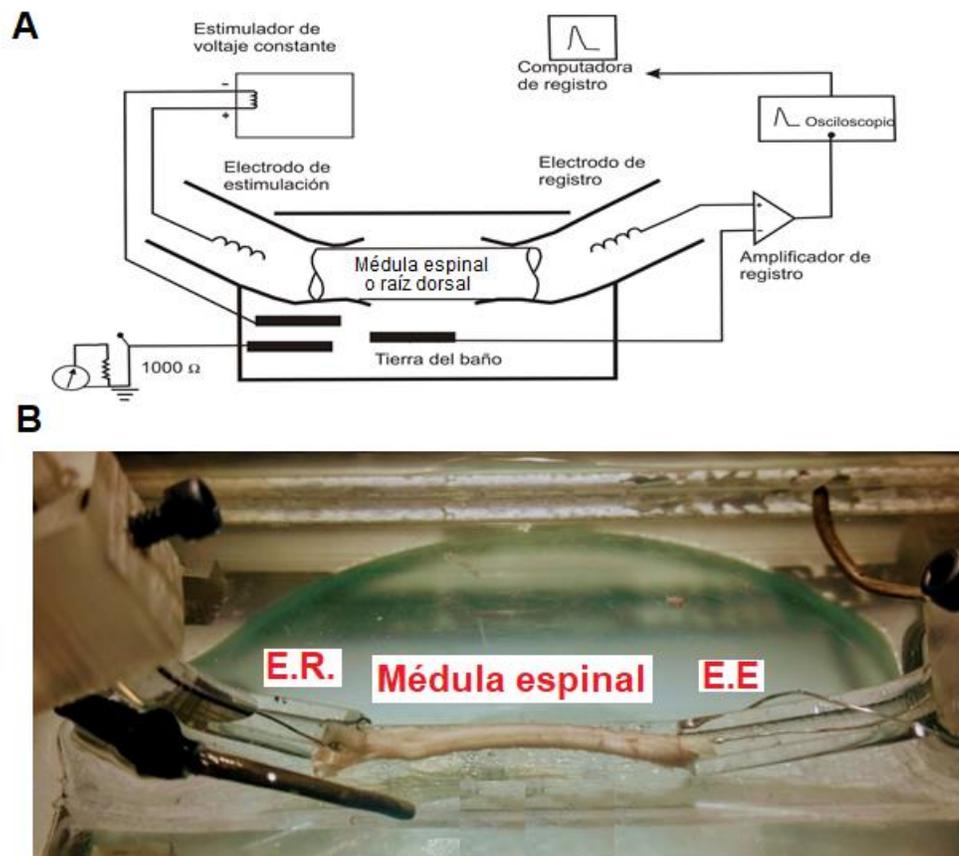
temperatura ambiente (23-25°C) (Figura 10). En el caso de la médula espinal extraída, se disecaron entre 5 a 8 mm de las columnas dorsales (conteniendo los fascículos cuneiformes y gracilis), tanto del extremo caudal como del rostral de la médula espinal extraída, mediante el uso de tijeras de iris y pinzas de disección finas. Subsecuentemente, las columnas dorsales caudales o la parte caudal de las raíces dorsales, se introdujeron mediante succión positiva (con ayuda de una jeringa de 5 ml) a un electrodo de succión de estimulación, construido con un tubo de plástico inerte, el cual contenía un par de alambres de plata clorurados, uno en su interior y el otro, cubierto con una capa de material aislante (excepto en la punta) enrollado en la parte externa del electrodo (Figura 10A y B), los cuales se conectaron a un estimulador que genera pulsos cuadrados de voltaje (0.5 ms de duración, y con diferentes intensidades de estimulación; Digitimer Devices, DS2A) y éste a un generador de pulsos (Digitimer Devices 3290) que controla la aplicación de los pulsos de estimulación a una frecuencia de 1 HZ).

La intensidad de la corriente eléctrica del estímulo se determinó a partir de la caída de voltaje a través de una resistencia de 1000Ω situada en la vía de retorno del sistema de registro a tierra (Figura 10A).

Por otro lado, para el registro del Potencial de Acción Compuesto (PAC) de las columnas dorsales o de las raíces dorsales, se utilizó otro electrodo de succión colocado en el extremo rostral de la médula espinal, el cual contenía un alambre de plata clorurado en su interior y otro, colocado en el baño de la preparación, que se utiliza como electrodo de referencia. Ambos alambres fueron conectados a un amplificador de bajo ruido y alta ganancia (Grass Instruments Mod. P11; sin filtro de 60 Hz, con filtros pasa-altos a 0.3 Hz y pasa-bajos a 3 KHz) y éste a un osciloscopio y en paralelo, la señal fue digitalizada mediante una tarjeta analógica-digital (National Instruments BNC 2090A) la cual estaba conectada a una computadora personal, para el análisis posterior de los registros electrofisiológicos (con frecuencia de captura del registro a 10 KHz) mediante la utilización de un programa de computación, elaborado para ello en ambiente LabView, en nuestro laboratorio.

La resistencia del sello generado entre la interfase nervio/electrodo fue establecida en un rango de 8-10 m $\Omega$ . Es importante mencionar que el sello apropiado de los electrodos de succión con el tejido provoca una reducción notoria del ruido eléctrico, particularmente el de 60 Hz, característico del uso de equipo electrónico. En caso de que la

resistencia del sello fuese menor al rango establecido y que se presente un incremento notorio en el ruido eléctrico de fondo, los registros así obtenidos fueron descartados.



**Figura 10.** Diagrama del dispositivo de registro del PAC de las columnas dorsales y de las raíces dorsales de la médula espinal de la rata.

### **Histología de las columnas y raíces dorsales**

A un grupo adicional de animales (n=7) se les disecó y extrajo un tramo (4-5 mm de longitud) de las raíces dorsales del segmento L5 de la médula espinal. En otro grupo de ratas (n=7), se les extrajo una pequeña sección del segmento espinal para su posterior análisis histológico. Para ello, las muestras de las raíces dorsales y de las columnas dorsales obtenidas fueron fijadas por inmersión en solución de Karnosky (glutaraldehído 1.25% / formaldehído 1.25% / ácido pícrico 0.03% / Buffer de cacodilato 0.15 M, pH 7.4) por 4 h a 4°C. Posteriormente, las muestras de tejido fueron lavadas con el mismo buffer y fijadas con tetraóxido de osmio 1% buffer de cacodilato por 90 minutos a 4°C para posteriormente ser deshidratadas en una serie de soluciones de etanol al 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%,90%, 10 min cada uno, tres veces a 100% por 10 min y dos veces en óxido de propileno por 10 min. Cada muestra fue preincubada en resina de óxido de propileno/epoxi 1:1 por 24 h, resina de óxido de propileno / epoxi 1:2 por 24 h y finalmente incubada en resina epoxi Epon 812 a 60°C. Se realizaron secciones transversales de 0.5 µm de las muestras mediante el uso de un ultra-micrótopo (Ultracut Reichert-Jung, 65 11 01) y teñidas

con azul de toluidina y cubiertas con resina Entellan para su observación en microscopio de luz.

Una de las secciones transversales de las médulas espinales extraídas y de la raíz dorsal L5 de cada animal fue elegida aleatoriamente y la región correspondiente a la parte media de las columnas dorsales o de la raíz dorsal fue fotografiada con una cámara digital de alta definición, montada en un microscopio invertido (AxioCam MRc, Zeiss). Posteriormente, mediante el uso del software Sigma Scan Pro (version 4.01, Systat Software) se midió el diámetro transversal y el grosor de la vaina de mielina de cada uno de los axones contenidos en la fotografía obtenida (200-800 axones).

## **ANALISIS DE RESULTADOS**

### **Registros electrofisiológicos**

Los PAC generados por la aplicación de 16 pulsos consecutivos, con cada una de las distintas intensidades empleadas (1.5, 3 y 5 veces umbral; xU) a las raíces dorsales o a las columnas dorsales fueron registrados y promediados. A tales potenciales se les determinó: a) umbral de activación; b) amplitud; c) área; c) duración; d) latencia al inicio y latencia al pico y se midió la longitud (en mm) del segmento de

raíz dorsal o de médula espinal en las que se hicieron los registros para calcular la velocidad de conducción máxima (al inicio del PAC) y media (al pico) del nervio. Los valores resultantes de todos los animales se agruparon y se les calculó el valor promedio ( $\pm$ EE). Las diferencias entre los valores para los PAC registrados en las raíces y las columnas dorsales fueron determinadas mediante una prueba ANOVA simple.

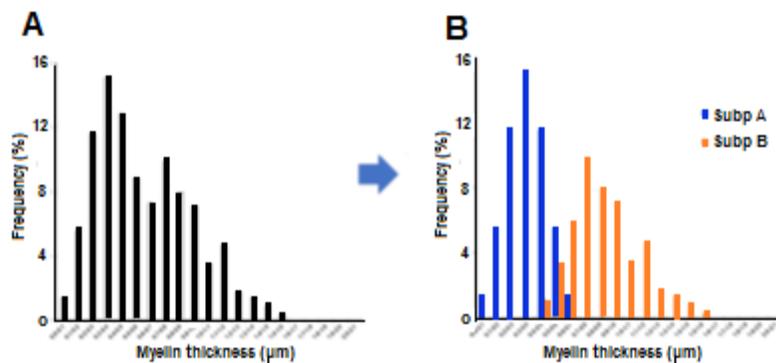
### **Histología:**

Para el análisis de las características histológicas de los axones, se midió el diámetro y el grosor de la mielina de los axones que se localizaban en los cortes histológicos (100x) de las raíces y las columnas dorsales de la médula espinal de la rata (Ver figuras 9 y 10). Posteriormente, mediante el uso del software Sigma Scan Pro (versión 4.01, Systat Software) se midió el diámetro transversal del nervio, así como el grosor de la vaina de mielina (Gm), el diámetro transversal (Da) y el diámetro total ( $Dt=Da+Gm$ ) de cada uno de los axones contenidos en las fotografías obtenidas (entre 200 y 800 axones). Así mismo, se calculó el valor de la proporción G ( $G \text{ ratio} = Da /Dt$ ) de cada axón. Subsecuentemente, todos los valores obtenidos para cada parámetro histológico determinado fueron agrupados y se promediaron y se obtuvo el valor del error estándar ( $\pm$ EE). Las diferencias entre las

características de los axones en las raíces dorsales y en las columnas dorsales de la médula espinal fueron analizadas mediante una prueba ANOVA de una sola variable.

Debido a que las distribuciones del diámetro transversal y del grosor de la mielina de los axones en las raíces dorsales no siguen una distribución binomial simple, sino una distribución bimodal (con dos picos; Ver sección de Resultados; Figura 10), decidimos emplear un análisis de pseudo-deconvolución, desarrollado por nuestro grupo en un estudio previo (Álvarez-Martínez et al., 2022). Tal análisis asume que la presencia de dos picos en la distribución de frecuencia porcentual del diámetro del axón o del grosor de la mielina sugiere la probable existencia de dos subpoblaciones de axones, cada una de ellas siguiendo una distribución binomial independiente, esto es, se tiene una Subpoblación A (Subp A) de axones que presentan diámetro pequeño o de poco grosor de mielina y una Subpoblación B (Subp B), consistente de axones con mayor diámetro o grosor de mielina. Como segunda instancia, consideramos que la distribución binomial de la Subp B se encuentra superpuesta sobre la fase de descenso de la distribución de la Subp A. Para el análisis de pseudo-deconvolución, llevamos a cabo los siguientes pasos: En primer lugar, asumimos que la fase de ascenso

de la distribución de la Subp A es un reflejo especular de la fase de descenso, por lo que sería posible “reconstruir” la fase de descenso al repetir los valores de la fase de ascenso del primer pico en la distribución porcentual, pero en orden inverso, de tal modo que se obtendría una probable distribución porcentual binomial de la Subp A (Figura 10).



**Figura 10.** Ejemplo del análisis de pseudo-deconvolución para la distribución de la frecuencia porcentual del grosor de la mielina. A) Distribución cruda de los datos obtenidos por la medición directa del grosor de la mielina; B) Distribución de las Subp A y Subp B obtenidas después del análisis de pseudo-deconvolución (ver texto)

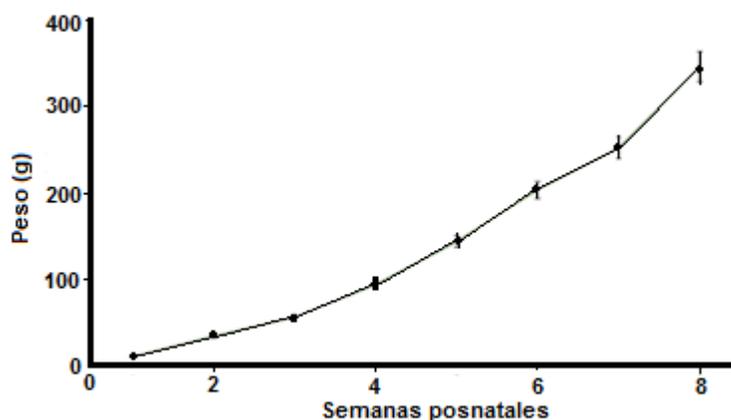
Ahora bien, la suma de los valores de la frecuencia porcentual en la distribución de la Subp A correspondería al porcentaje de axones que presentan relativamente poco grosor de mielina o con pequeño diámetro axonal, mientras que el porcentaje de axones con relativamente mayor grosor de mielina o diámetro axonal (Subp B) se puede calcular al restar

el valor porcentual de la Subp A de la distribución de frecuencia porcentual total (Figura 10B).

## RESULTADOS

### Peso corporal.

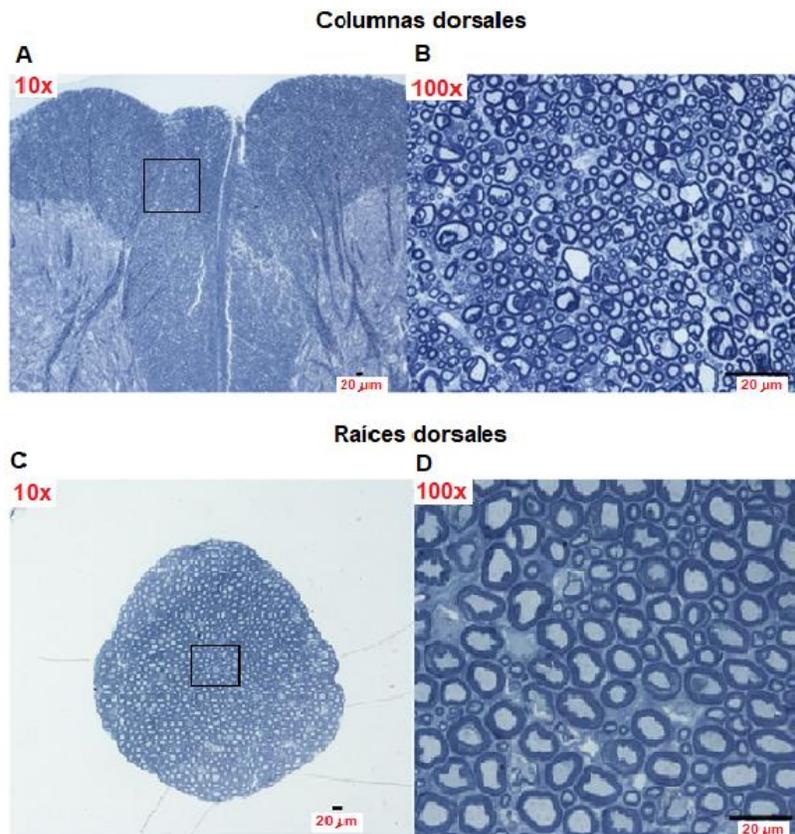
Los valores promedio ( $\pm$ EE) del peso corporal de los animales experimentales se indican en la gráfica de la Figura 11. En esta gráfica se puede observar que los animales presentan un incremento de peso que sigue una función exponencial, semejante al reportado en otros estudios (Cossio, et al., 2013; Álvarez-Martínez, et al 2022) y que corresponde al crecimiento normal de los animales.



**Figura 11.** Gráfica de los valores promedio ( $\pm$  E.E.) del peso corporal de las ratas macho experimentales obtenidas en distintas edades posnatales (N = 32).

**Características histológicas de los axones aferentes en las raíces y cuernos dorsales de la médula espinal.**

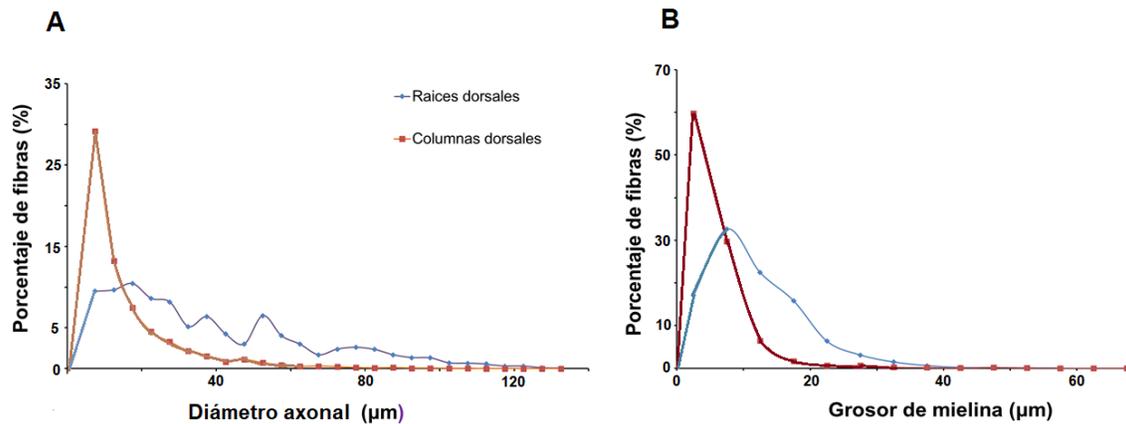
En la Figura 12 se muestran microfotografías representativas de los cortes realizados a las columnas y raíces dorsales del segmento lumbar L5 de la médula espinal de la rata, tomadas con dos ampliificaciones, la primera a 10x (A, C) y la segunda a 100x (B, D), respectivamente.



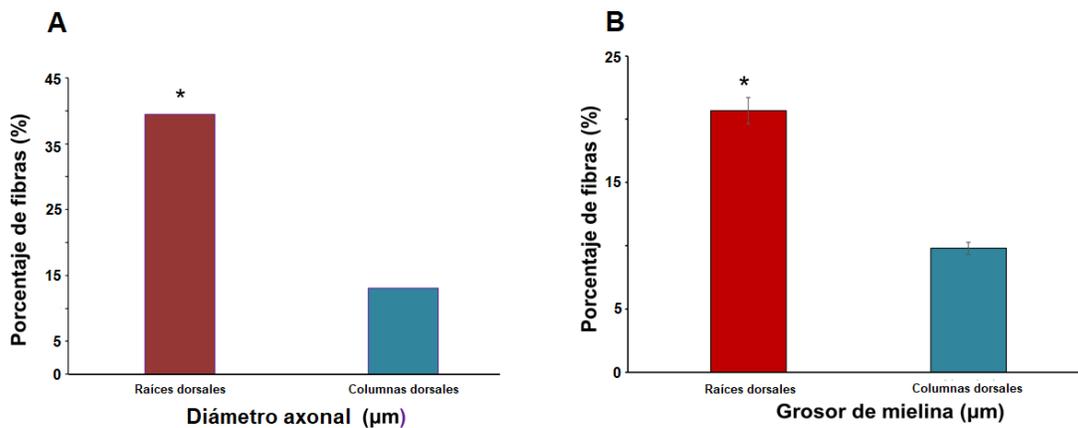
**Figura 12.** Microfotografías representativas de un corte de la Columna dorsal en L5 con distintas ampliaciones: (A) 10x y (B) 100x, y de una raíz dorsal L5 a (C) 10x y (D) 100x, teñidas con azul de Toluidina.

Al comparar ambas microfotografías, se puede apreciar que los axones en el corte de la raíz dorsal presentan mayor diámetro transversal y grosor de la mielina que los axones en el corte de las columnas dorsales, presentándose en esta última una predominancia de axones de pequeño diámetro.

Lo anterior se corrobora en las gráficas A y B de las Figura 13, las cuales contienen las distribuciones de frecuencia de los valores porcentuales del diámetro de axones en las columnas dorsales de la médula espinal ( $N_{\text{columnas}}=4789$  axones) y en las raíces dorsales de la rata ( $N_{\text{raíces}}=2233$  axones), respectivamente. Tal y como puede apreciarse en estas gráficas, los axones de las columnas dorsales (distribución en rojo) presentan menor diámetro y grosor de mielina, así como menor dispersión de valores, que los axones de las raíces dorsales (distribución en azul). Lo cual se corrobora al obtener los valores promedio del diámetro axonal y el grosor de la mielina, los cuales son mayores para los axones de las raíces dorsales que para los axones de las columnas dorsales (Figura 13 A; ANOVA simple,  $P<0.05$  y  $P<0.05$ , respectivamente).



**Figura 13.** A) Distribución porcentual del diámetro transversal de axones en columnas dorsales de la médula espinal y de las raíces dorsales. B) Distribución porcentual del grosor de la mielina en axones de las columnas dorsales de la médula espinal y de las raíces dorsales.



**Figura 14.** Gráficas del valor promedio ( $\pm$ E.E.) del diámetro transversal (A) y del grosor de la mielina (B) de los axones de las raíces dorsales y de las columnas dorsales de la médula espinal de la rata. Los asteriscos

indican la diferencia estadística entre los grupos. ANOVA,  $P_{\text{diámetro}} < 0.05$  y  $P_{\text{grosor}} < 0.05$

Por otra parte, el valor de la proporción G promedio es significativamente mayor en los axones aferentes de las raíces dorsales que en los axones aferentes de las columnas dorsales (Figura 15 B).

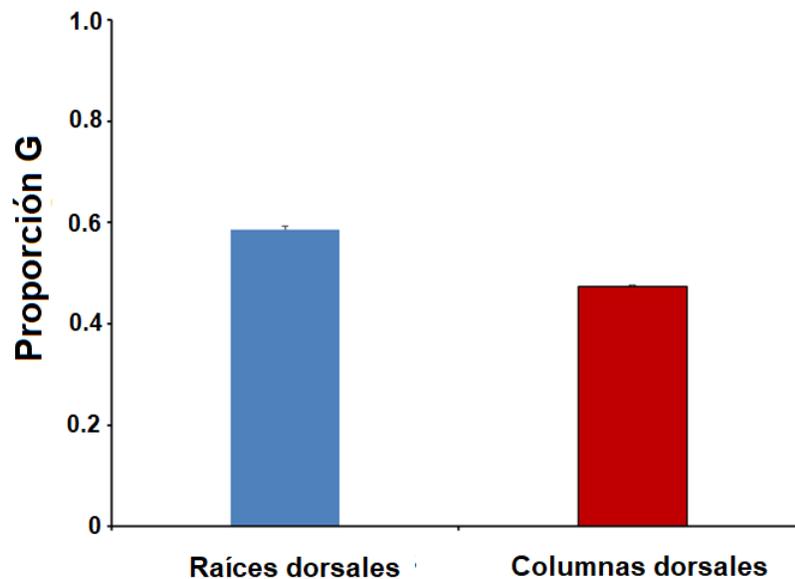
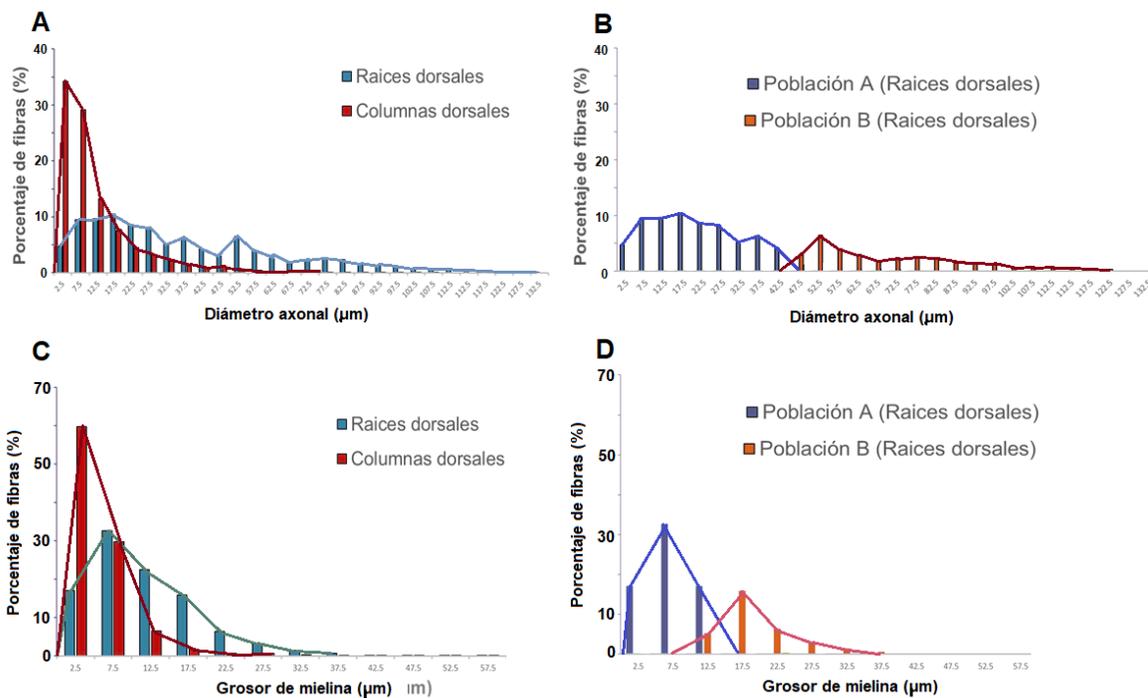


Figura 15. Valores promedio de la Proporción G determinada en axones de las columnas dorsales y de las raíces dorsales de la médula espinal de la rata.

Por otra parte, mediante el análisis de pseudo-deconvolución descrito en la sección de Métodos, pudo establecerse que las distribuciones de frecuencia porcentual del diámetro y del grosor de la mielina en las

raíces dorsales presentan dos subpoblaciones (Figura 14 B y D), una que corresponde a axones de poco diámetro y grosor de mielina y otra a axones de mayor diámetro y grosor de mielina.



**Figura 16.** A y C) Distribuciones porcentual del diámetro transversal y del grosor de la mielina de axones en las Raíces dorsales y en las Columnas dorsales de la médula espinal. B y C) Desconvolución de la distribución porcentual del diámetro transversal y del grosor de la mielina de los axones de las raíces dorsales. Note que no se exhibe la desconvolución de la distribución de las columnas dorsales debido a que en la distribución original no se presentan dos picos.

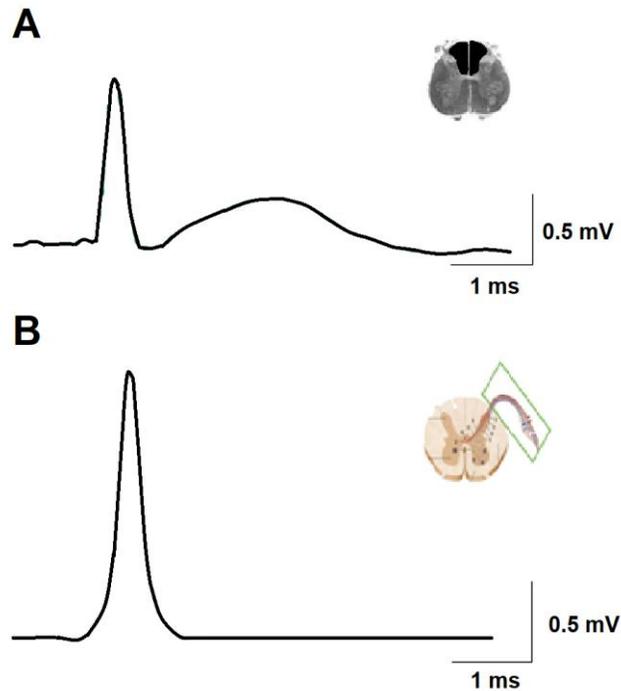
En cambio, las columnas dorsales contienen axones cuyo diámetro y grosor de mielina siguen una distribución de frecuencia porcentual con un solo componente, el cual corresponde a axones de diámetro y grosor

de mielina relativamente pequeños. Debido a que las distribuciones porcentuales del diámetro y grosor y los axones no presentaban indicios de un segundo pico, no se les aplicó el método de desconvolución.

## **Registros electrofisiológicos.**

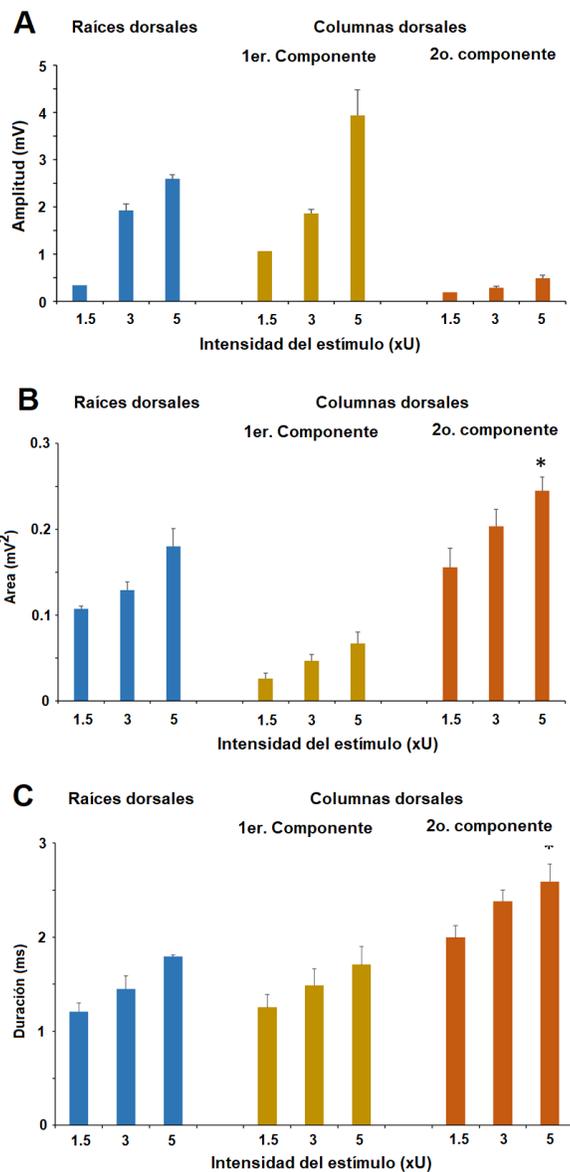
La Figura 17 A y B muestra registros característicos del potencial de acción compuesto (PAC) generado en las columnas dorsales y de una raíz dorsal en el segmento L5 de la médula espinal, respectivamente. Por un lado, el PAC de las columnas dorsales presenta 2 componentes: el primero con una latencia de aparición y duración breves, pero de gran amplitud y área, en comparación con un segundo componente de menor amplitud, pero de mayor latencia y duración (Figura 17A). En cambio, los potenciales de raíz dorsal están constituidos por un solo componente, cuya amplitud y área son de similar magnitud, aunque de similar latencia de aparición y duración que el primer componente del PAC de las columnas dorsales (Figura 17B).

Los valores promedio ( $\pm$ EE) de la amplitud, área y duración de los PAC generados por estímulos de intensidad 1.5xU, 3xU y 5xU, registrados en raíces dorsales (n= 7) y columnas dorsales (n= 7) de la médula espinal se grafican en la Figura 18.



**Figura 17.** A) PAC provocado por la estimulación de las columnas dorsales en el segmento L5 espinal, con una intensidad de 3xU. Inserto: Microfotografía que ilustra la región de las columnas dorsales de la médula espinal. B) PAC registrado en la raíz dorsal L5 (3xT) de la médula espinal de la rata. Inserto: Esquema que ilustra de una raíz dorsal.

Como puede observarse en las gráficas A y B de esta figura, los valores promedio de la amplitud y área del PAC generado en las raíces dorsales, así como las del primer componente del PAC provocado en las columnas dorsales, incrementan gradualmente de magnitud a medida que aumenta la intensidad del estímulo aplicado.



**Figura 18.** A) Amplitud de los componentes del PAC registrados obtenidos a 1.5x, 3x y 5x de la intensidad umbral del estímulo. B) gráficos correspondientes al área de los componentes del PAC evaluados y respectivamente obtenidos a 1.5x, 3x y 5x el valor umbral. C) Duración variable en los componentes eléctricos evaluados y obtenidos a 1.5x, 3x y 5x el valor umbral, respectivamente.

A pesar de que el segundo componente del PAC generado en las columnas dorsales incrementa de amplitud al aumentar la intensidad del estímulo, éste es de considerable menor magnitud que el de los otros potenciales analizados (Figura 18 A). En cambio, el área del segundo componente del PAC de las columnas dorsales fue significativamente mayor que el área de primer componente y del PAC de las raíces dorsales (Figura 18 B), ello se debe posiblemente a que el segundo componente es de mayor duración que el primer componente y el de las raíces dorsales (Figura 18 C).

Así mismo, la amplitud del primer componente contra el segundo componente del PAC registrado en las columnas dorsales presenta diferencias significativas, al igual que con el PAC de las raíces dorsales ( $P < 0.012$ ; chi cuadrada y Kruskal-Wallis). Del mismo modo, el área y duración del segundo componente fue mayor que la del primer componente y del PAC de las raíces dorsales (Figura 18B y C.  $P < 0.0391$  y  $P < 0.046$ ; chi cuadrada y Kruskal-Wallis, respectivamente).

## Discusión

Los resultados obtenidos en la presente tesis muestran que los axones de las columnas dorsales de la médula espinal tienen un diámetro homogéneo, en su mayoría menor a  $\sim 40 \mu\text{m}$  y alrededor de un 85% de ellos, posee un grosor de la capa de mielina menor a  $20 \mu\text{m}$ . En cambio, los axones de las raíces dorsales tienen un amplio rango de diámetros transversales, los cuales van de  $\sim 3 \mu\text{m}$  a  $\sim 100 \mu\text{m}$  y el grosor de la mielina se encuentra entre 20 y  $40 \mu\text{m}$ .

El análisis de pseudo-deconvolución (Alvarez et al., 2022) utilizado en la presente tesis muestra que las raíces dorsales presentan dos subpoblaciones de axones aferentes, cuyas características estructurales parecen ser distintas, esto es, se presenta una subpoblación de mayor diámetro y grosor de mielina, y otra de menor diámetro transversal y grosor de mielina. En cambio, las columnas dorsales presentan sólo una población de axones, cuyo diámetro y grosor de mielina son relativamente homogéneos.

Por otro lado, el valor promedio de la proporción  $G$  que se obtuvo en la presente tesis para los axones de las raíces dorsales fue de 0.58 ( $\pm 0.04$ ), valor semejante a lo reportado por otros investigadores en la

literatura (Waxman y Bennett, 1972). En cambio, los axones de las columnas dorsales presentaron un valor promedio de 0.47 ( $\pm 0.03$ ). En este caso es necesario señalar que en el Sistema Nervioso Central, los valores de la proporción G pueden ser diversos y dependen de un gran número de factores (Stikov N., et al., 2015). Por ejemplo, en algunos axones nerviosos del humano, el diámetro del axón alcanza su máximo crecimiento a los cinco años de edad, pero el espesor de las capas de mielina incrementa durante la niñez, hasta sobrepasar la adolescencia, lo que genera una disminución gradual de la proporción G durante el crecimiento (Schröder et al., 1988).

De acuerdo con nuestras observaciones, es factible afirmar que los axones aferentes de las raíces dorsales, a pesar de tener mayor diámetro, tienen menor grado de mielinización que los axones presentes en las columnas dorsales, las cuales tienen un menor diámetro, pero mayor grado de mielinización. La observación de que los axones aferentes de las raíces dorsales presentan mayor diámetro que los de las columnas dorsales es comprensible si se considera que los axones de estas últimas son ramificaciones colaterales de los axones aferentes periféricos que ingresan a la médula espinal, esto es, los axones aferentes al ingresar a regiones dorsales del cuerno posterior, se

dividen en dos ramificaciones: una de ellas penetra a la sustancia blanca en donde alcanza a hacer contacto sináptico con células internunciales o de segundo orden, mientras que la otra colateral ingresa a las columnas dorsales, en donde proyecta a regiones centrales o caudales de la médula espinal (Figura 18)(Brown A.,1981).

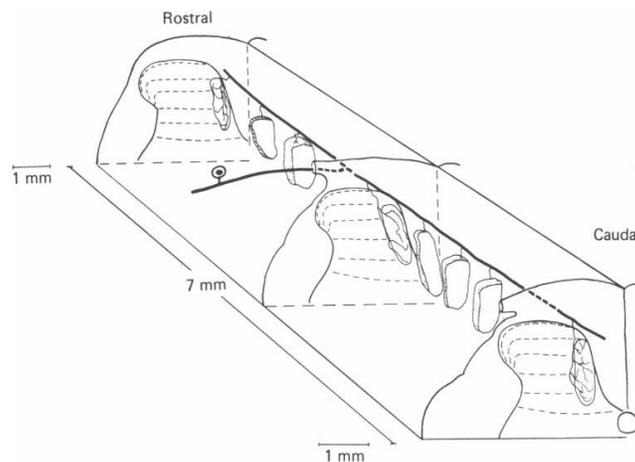


Figura 19. Proyección de un axón aferente proveniente de un receptor sensorial cutáneo al ingresar a la médula espinal. Note la proyección rostral y caudal de la fibra en las columnas dorsales. (Fyffe, 1985)

Por otra parte, dado que los axones del sistema nervioso periférico (incluyendo a los de las raíces dorsales) son mielinizados por las células de Schwann y los axones del sistema nervioso central (columnas dorsales) por los oligodendrocitos, la observación de que los axones de las raíces dorsales presentan menor grado de mielinización que un

porcentaje alto de los axones presentes en las columnas dorsales, permite proponer que las células oligodendrogliales mielinizan en menor proporción que las células de Schwann. En este momento es importante mencionar que las columnas dorsales en un segmento (en este caso el segmento L5) pueden estar constituidas por axones provenientes de la raíz dorsal del mismo segmento (L5) como por otros axones de raíces dorsales caudales o bien por axones de células internunciales que envían sus proyecciones axonales por las columnas dorsales (Nachum,2020). Esto es de interés, ya que esta condición permite analizar las propiedades de generación y propagación del potencial de acción en segmentos centrales y periféricos de axones con distintos grados de mielinización.

En cuanto a nuestros resultados electrofisiológicos, podemos señalar que el potencial de acción compuesto en las columnas dorsales muestra 2 componentes, de distinta latencia de inicio y al pico, así como de amplitud y área que se presentan ante estímulos de intensidad creciente (1.5xU, 3xU y 5xU). Tales componentes aumentan de amplitud y latencia al pico a medida que se incrementa la intensidad del estímulo, lo que permite establecer que se presenta un reclutamiento de axones de mayor umbral en ambos componentes, que se van activando

conforme se incrementa la intensidad del estímulo (Velumian et al., 2011).

Dado que el primer componente del PAC generado en las columnas dorsales presenta mayor amplitud, pero menor duración que el segundo componente, ello explica la razón de porqué el segundo componente tiene mayor área que el primero (Figura 17C); esto último implica que el segundo componente del PAC es el resultado de un mayor número de axones que los que se activan para el primer componente. En cambio, las raíces dorsales presentan un PAC con un solo componente, el cual aumenta tanto de amplitud, duración y área a medida que se incrementa la intensidad del estímulo (Figura 17 A y B), lo cual podría deberse a la activación y reclutamiento de axones con características electrofisiológicas semejantes.

Si bien, los axones contenidos en las columnas dorsales de la médula espinal al parecer conforman una población relativamente homogénea en cuanto a sus características histológicas, ello no es excluyente que desde el punto de vista electrofisiológico, dichos axones se agrupen en 2 subpoblaciones, lo que permitiría explicar los dos componentes del PAC de las columnas dorsales, esto es, que existan dos poblaciones de axones en las columnas dorsales con distintas cualidades

electrofisiológicas que les provean diferente grado de propagación y generación del potencial de acción.

Lo contrario ocurre con los axones en las raíces dorsales, los cuales al parecer conforman 2 subpoblaciones de diámetro y grosor de mielina diferentes, pero presentan PACs con un solo componente, cuya amplitud, duración y área se asemejan a los del primer componente del PAC de las columnas dorsales, por lo que se podría proponer que a pesar de sus diferencias histológicas presentan niveles de activación y propagación semejantes entre sí. Sin embargo, las propuestas anteriores deben analizarse con mucho mayor detalle, utilizando para ello procedimientos experimentales diferentes a los empleados en el presente estudio.

Finalmente, es importante señalar que los resultados obtenidos en esta tesis podrían ser utilizados como punto de referencia en otros estudios en los que se analicen los efectos de distintas condiciones experimentales, tales como la diabetes, desnutrición, obesidad, sobre la mielinización y la estructura de axones, tanto periféricos como centrales de la rata.

## **Conclusiones**

Los axones de las columnas dorsales (SNC) y de las raíces dorsales (SNP) poseen características histológicas y electrofisiológicas diferentes entre sí, particularmente en la mielinización de los axones periféricos (células de Schwann) y centrales (oligodendrocitos) y el número de componentes en el PAC generado en ambas estructuras espinales.

## **Perspectivas del estudio**

-Establecer si existen diferencias en la propagación del PAC y en la mielinización de los axones en las raíces dorsales o ventrales de la médula espinal de la rata.

-Estudiar los efectos de distintas enfermedades desmielinizantes, tales como la diabetes o la malnutrición (obesidad o desnutrición) sobre el PAC y la mielinización axonal a nivel de Sistema Nervioso Central y Periférico.

-Analizar si la rehabilitación alimenticia es capaz de restablecer la mielinización y la generación del PAC, tanto en las raíces dorsales, ventrales y en las columnas dorsales.

-Estudiar el efecto de algunos compuestos mielinizantes (por ej: las  $\beta$ -carbolinas) sobre las alteraciones en la propagación del PAC o la mielinización de los axones en las raíces dorsales y en las columnas dorsales de la médula espinal de la rata.

## **Bibliografía**

Afifi A., & Bergman R., (Eds.), (2021). Neuroanatomía Funcional: Texto y Atlas, 3e. McGraw Hill.

Abraira V., Ginty D., (2013), The sensory neurons of touch. Neuron 79: 618–639.

Albert M., Antel J., Bruck W., Stadelmann C. (2007) Extensive cortical remyelination in patients with chronic multiple sclerosis. Brain Pathol. 17:129–138.

Al-Chaer E., Lawand N., Westlund K., Willis W., (1996), Pelvic visceral input into the nucleus gracilis is largely mediated by the postsynaptic dorsal column pathway. J Neurophysiol 76, 2675-2690.

Antal M., (1984), Termination areas of corticobulbar and corticospinal fibres in the rat. J Hirnforsch 25, 647-659.

Barret K., Barman S., Boitano S., Brooks H., (2013) Ganong Fisiologia Medica, Edición 24, McGraw Hill interamericana.

Boron W., Boulpaep E. (2017), Fisiología Medica 3er edición., Ed. Elsevier.

Burton H., Loewy A., (1977), Projections to the spinal cord from medullary somatosensory relay nuclei. J Comp Neurol 173, 773-792.

Brown A., Fyffe R., Rose P., Snow P., (1981), Spinal cord collaterals from axons of type II slowly adapting units in the cat. The Journal of Physiology, 316.

Campero M., Hughes R., Orellana P., Bevilacqua J., Guiloff R., (2018), Spinal cord infarction with ipsilateral segmental neuropathic pain and flaccid paralysis. A functional role for human afferent ventral root small sensory fibres. J Neurol Sci., Dec 15;395:84-87.

Carlson B., (2002), Neuroanatomy of the mormyrid electromotor control system. J Comp Neurol., Dec 23;454(4):440-55.

Carpenter M., (1992), Vascularización del sistema nervioso central. En: Fundamentos de neuroanatomía (pp 348-369). Buenos Aires: Editorial El A.

Cossio M., Gómez R., Vargas R., Hochmuller R., & Arruda M., (2013). Curvas de referencia para valorar el crecimiento físico de ratas machos Wistar. *Nutrición Hospitalaria*, 28(6), 2151-2156.teneo.

Erlanger J, Gasser H. (1924), The compound nature of the action current of nerve as disclosed by the cathode ray oscillograph. *Am. J. Physiol.* – Leg Content 70(3), 624–666.

Fontenas L., Kucenas S. (2018) Motor exit point (MEP) Glia: Novel myelinating glia that bridges CNS and PNS myelin. *Frontiers in cellular neuroscience*.

Fontenas L, Kucenas S. (2017), Living on the Edge: glia shape nervous system transition zones. *Current Opinion in Neurobiology*. Dec; 47:44-51.

Hill R., Wyse G., Anderson M., (2012). *Animal Physiology*, 3a ed. Sunderland, Massachusetts, Sinauer.

Jessen K., Mirsky R. (2005) The origin and development of glial cells in peripheral nerves., *Nature Reviews, Neuroscience*.

John L Parker J., Shariat N., Karantonis D., (2018) Electrically evoked compound action potential recording in peripheral nerves., *Bioelectronics in Medicine* Volume 1, Issue 1, Pages 71-83.

Konig H., Liebich H., (2011) Anatomía de los animales domésticos / 2 ed. / tomo 2 órganos sistema circulatorio y sistema nervioso., Ed. Medica Panamericana.

Li K, Cai B, Li C, Zhang X. Presynaptic inhibition of nociceptive neurotransmission by somatosensory neuron-secreted suppressors. *Sci China Life Sci.* 2017 Sep;60(9):1013-1018.

Matoba K., Muramatsu R., Yamashita T., (2017) The role of leptin in the central nervous system remyelination.

Martínez-Álvarez, V., Segura-Alegría, B., Rodríguez-Torres, E.E., Porras, M.G., Aguirre-Benítez, E., González del Pliego, M., Hudson, R., Quiroz-González, S., Melo, A.I., & Jiménez-Estrada, I. (2022). Mother and sibling interactions during the preweaning period influence myelination and impulse propagation of the sensory sural nerve in the adult rat. *Developmental Psychobiology*, 64.

Melo A., Zempoalteca R., Martínez V., Hoffman K., Jiménez I. Postnatal development, electrophysiology, and sensory sural nerves. En: Colin R. Martin, Victor R Preedy and Rajkumar Rajendrun (Eds). *Factors affecting Neurodevelopment. Genetics, Neurology, Behavior and diet.* Elsevier, New York, Chapter 25 pp: 287-297.

Nachum Dafny, (2020), Neuroscience Electronic Textbook., Department of Neurobiology and Anatomy, The UT Medical School at Houston.

Schröder J., Bohl J., von Bardeleben U., (1988). Changes of the ratio between myelin thickness and axon diameter in human developing sural, femoral, ulnar, facial, and trochlear nerves. *Acta Neuropathol.* 76, 471–483.

Stikov N., Campbell, J., Stroh T., Lavelée M., Frey S., Novek J. (2015). *In vivo histology of the myelin g-ratio with magnetic resonance imaging. NeuroImage, 118, 397–405.*

Saher G., Brugger B., Corinna L., Mobius W., Tozawa R., Wehr M., Wieland F., Ishibashi S., Nave K. (2005), High cholesterol level is essential for myelin membrane growth., volume 8, number 4, april 2005, Nature Neuroscience.

Saliani A., Perraud B., (2017) Duval Tanguy, Stikov Nikola, Rossignol Serge, Cohen-Adad Julien., *Frontiers in Neuroanatomy.*

Segura, B., Guadarrama, J.C. Gutierrez, A.L., Merchant, H., Cintra, L. and Jiménez, I.: Effect of perinatal food deficiencies on the compound action potential evoked in sensory nerves of developing rats. *Nutritional Neuroscience* 4(6): 475-488 (2001).

Smith KJ, Bennett BJ (1987), Topographic and quantitative description of rat dorsal column fibres arising from the lumbar dorsal roots. *J Anat* 153, 203-215.

Tchoyoson L., (2011). Neuroimaging in Postinfectious Demyelination and Nutritional Disorders of the Central Nervous System. *Neuroimaging Clinics of North America*, 21(4), 843–858.

Thirumalai V, Jha U. Recruitment of Motoneurons. *Adv Neurobiol.* 2022; 28:169-190. doi: 10.1007/978-3-031-07167-6\_8. PMID: 36066826.

Vásconez J., Delgado M., López B., Gámez E., Vargas R., (2022). Alteraciones En El Sistema Nervioso Producido Por La Obesidad. *Revista Ecuatoriana de Neurología*, 31(2), 65-73.

Velumian A., Wan Y., Samoilova M., and Fehlings M., (2011), Contribution of fast and slow conducting myelinated axons to single-peak compound action potentials in rat spinal cord white matter preparations., *J Neurophysiol* 105: 929 –941.

Waxman S.G., Bennett M.V. (1972) Relative conduction velocities of small myelinated and non-myelinated fibres in the central nervous system. *Nat. New Biol.* 238:217–219.