

neuronas axotomizadas mediante implante de tejido nervioso embrionario

Recovery of the discharge activity of axotomized neurons by the implant of embryonic nervous tissue

Departamento de Fisiología y Biología Animal
Facultad de Biología
Sevilla

Benítez-Temiño B.
Pastor Loro A. M.
Rodríguez de la Cruz R. M.^a

RESUMEN

El objetivo fundamental del presente trabajo ha sido determinar si las alteraciones del disparo producidas por una lesión neuronal, como la axotomía, pueden revertir tras la reinnervación de una nueva diana, provista mediante implante de tejido nervioso embrionario. Para ello, se seccionó el fascículo longitudinal medial en gatos adultos, lo que produjo la axotomía de las neuronas internucleares del núcleo del motor ocular externo, y se procedió a implantar primordio cerebeloso en el sitio de lesión. Mediante técnicas morfológicas y fisiológicas obtuvimos los siguientes resultados: *i*) el implante se integró en el troncoencéfalo adulto y se desarrolló como un cerebelo normal, con lóbulos, tres capas en la corteza y los tipos celulares apropiados; *ii*) los axones seccionados de las neuronas internucleares invadieron el implante, ramificándose y estableciendo contactos sinápticos en las tres capas del cerebelo implantado; *iii*) las alteraciones electrofisiológicas producidas por la axotomía en las neuronas internucleares (como disminución de la frecuencia de disparo y pérdida de las señales oculomotoras) revirtieron hacia la normalidad. Por tanto, estos datos indican que el implante de tejido nervioso embrionario consigue rescatar funcionalmente a las neuronas axotomizadas del huésped, probablemente como resultado del restablecimiento de conexiones sinápticas con esta nueva diana.

Palabras clave: *Transplante neuronal, axotomía, núcleo del motor ocular externo, registro eléctrico unitario, inmunocitoquímica, microscopía electrónica.*

Benítez-Temiño B, Pastor Loro A M, Rodríguez de la Cruz R M.^a Recuperación de la actividad de disparo en neuronas axotomizadas mediante implante de tejido nervioso embrionario *Mapfre Medicina*, 2002; 13: 20-29

ABSTRACT

The present work has been aimed at determining whether the firing alterations induced by a neuronal injury, such as axotomy, can be reverted by the reinnervation of a new target, provided by the implant of embryonic nervous tissue. For this purpose, we sectioned the medial longitudinal fascicle in adult cats to axotomize the abducens internuclear neurons, and then implanted primordium of embryonic cerebellum at the lesion site. By morphological and physiological techniques we obtained the following results: *i*) the implant integrated and developed in the adult brainstem as a normal cerebellum, with lobes, three layers in the cortex and the appropriate cellular types; *ii*) the sectioned axons of abducens internuclear neurons invaded the implant, where they ramified and established synaptic contacts in the three layers of the implanted cerebellum; *iii*) the electrophysiological alterations produced by axotomy in abducens internuclear neurons (such as a reduction in firing rate and a loss of eye-related signals) recovered toward normality. Therefore, these data indicate that the implant of embryonic nervous tissue is able to functionally rescue the axotomized neurons of the host, probably as a result of the reestablishment of synaptic connections with this new target.

Key words: *Neuronal transplant, axotomy, abducens nucleus, single-unit recordings, immunocytochemistry, electron microscopy.*

Benítez-Temiño B, Pastor Loro A M, Rodríguez de la Cruz R M.^a Recovery of the discharge activity of axotomized neurons by the implant of embryonic nervous tissue *Mapfre Medicina*, 2002; 13: 20-29

Correspondencia:

Rosa Rodríguez de la Cruz
Departamento de Fisiología y Biología Animal
Facultad de Biología
Avda. Reina Mercedes, 6
41012-Sevilla
E-mail: rmrcruz@cica.es

Fecha de recepción: 10 de enero de 2001

INTRODUCCIÓN

La teoría trófica de las conexiones neuronales postula que las neuronas dependen del contacto con sus células postsinápticas (o células diana) para su supervivencia así como para la expresión adecuada de sus propiedades morfofuncionales (1). La dependencia de las neuronas por su diana es máxima en los estadios embrionario y postnatal temprano, de manera que cualquier manipulación experimental que interrumpa la conexión de una neurona con su diana se traduce en muerte celular retrógrada (1-4). Parece que son señales moleculares, los llamados factores neurotróficos, los mediadores de esta influencia retrógrada (1, 5, 6). Los factores neurotróficos son proteínas producidas por las células postsinápticas; tras su unión a receptores específicos en los terminales de la célula presináptica, estas moléculas viajan retrógradamente a lo largo del axón hasta llegar al soma, donde ponen en marcha todo un programa genético que, en definitiva, supone la expresión del fenotipo normal de la neurona presináptica (7, 8).

Sin embargo, en el sistema nervioso adulto la situación es algo diferente. Así, en mamíferos adultos se ha comprobado que la ablación de las células diana no conlleva muerte celular retrógrada, aunque produce alteraciones estructurales y funcionales que indican que la dependencia trófica aún está presente (9-12). Por ejemplo, las neuronas septales presentan una disminución del tamaño somático y de la síntesis de enzimas relacionados con la neurotransmisión tras la destrucción de su diana hipocámpal (12). Neuronas premotoras del sistema oculomotor sufren una reducción de la frecuencia de disparo de potenciales de acción y una pérdida de las señales de posición y velocidad ocular tras la pérdida de la conexión con sus motoneuronas diana, realizada bien por eliminación selectiva de las motoneuronas (9, 10), o bien por la sección de sus axones, esto es, por axotomía (13).

El objetivo del presente trabajo ha sido determinar si neuronas axotomizadas pueden recuperar sus propiedades de disparo cuando se les facilita la reinervación de una nueva diana. Para ello se pretende proveer de diana a los axones seccionados de neuronas del sistema nervioso central mediante el implante de tejido nervioso embrionario, ya que se trata de un sustrato favorable para el crecimiento axonal y una fuente importante de factores neurotróficos (14). El modelo experimental que se utilizó fue el sistema oculomotor del gato, del que se conoce bastante bien su

anatomía y fisiología (15-17). En concreto, se utilizó la proyección de las neuronas internucleares del núcleo del motor ocular externo (NMOE) sobre las motoneuronas del recto interno situadas en el núcleo del motor ocular común (NMOC). Los axones de estas neuronas cursan por el fascículo longitudinal medial (FLM) contralateral hacia su diana en el NMOC. Por tanto, se realizó la axotomía de las neuronas internucleares del NMOE mediante la sección del FLM y se implantó tejido embrionario (extraído del primordio cerebeloso) en el sitio de la lesión para averiguar si estas neuronas son susceptibles de regenerar cuando el sustrato de crecimiento es adecuado y de recuperar sus propiedades de disparo tras la reinervación.

MATERIAL Y MÉTODOS

Se utilizaron tres gatos adultos de 2-3 kg de peso. Todos los procedimientos experimentales se realizaron de acuerdo con las directivas de la Unión Europea (86/609/EU) y a la legislación española actual que regula el uso y cuidado de los animales de laboratorio (BOE 67/8509-12, 1988).

Axotomía e implante de tejido embrionario

Bajo anestesia general (pentobarbital sódico, 35 mg/kg, i.p.), se colocó al animal en un aparato estereotáxico. Tras abrir una ventana de 6x6 mm en el hueso occipital, se seccionó el FLM bilateralmente utilizando una microcuchilla de 3 mm de ancho. La sección de ambos fascículos se realizó a nivel del cero estereotáxico, justo caudal al núcleo troclear, 5 mm rostral al NMOE (18). A continuación se procedió a implantar el tejido embrionario en el sitio de la lesión utilizando una jeringa Hamilton (Figura 1). El implante consistió en 1,5 µl de primordio cerebeloso que fueron inyectados en cada fascículo.

Los embriones de 15 días (E15) se extrajeron mediante cesárea y se mantuvieron en medio HBSS (*Hank's Balanced Salt Solution*). Bajo microscopía en campana de flujo laminar se aislaron y disociaron mecánicamente los primordios cerebelosos.

Preparación de los animales para el registro crónico

Tras la semana de recuperación, los animales se prepararon para el registro crónico de la activi-

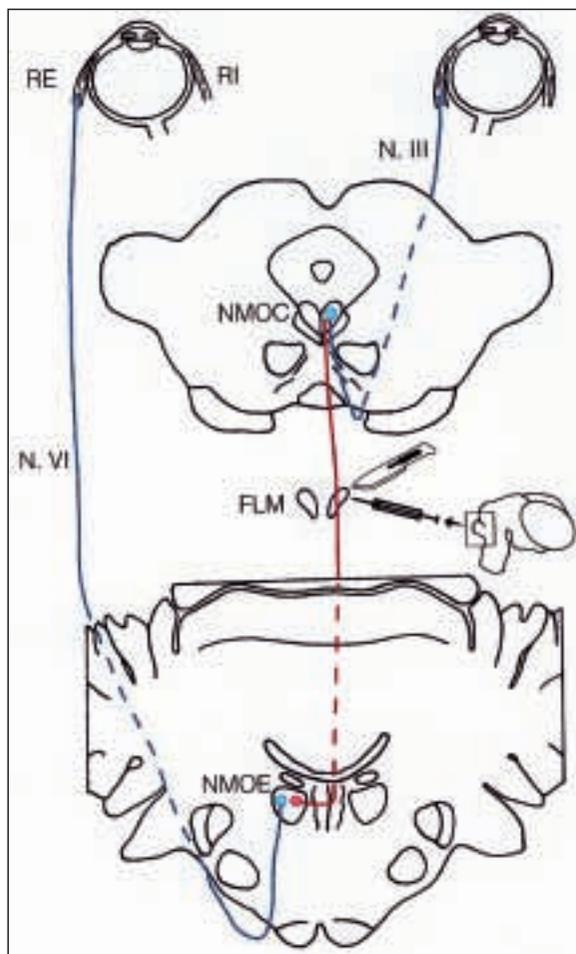


Figura 1. Diagrama experimental. En rojo se muestra la proyección objeto de estudio: las neuronas internucleares del núcleo del motor ocular externo (NMOE) proyectan a través del fascículo longitudinal medial (FLM) contralateral hacia el núcleo del motor ocular común (NMOC), donde conectan con las motoneuronas que inervan el músculo recto interno (RI). Estas neuronas se axotomizaron por sección del FLM y en el sitio de lesión se inyectó el trasplante de cerebelo embrionario. El diagrama ilustra también las motoneuronas del NMOE cuyos axones forman el sexto par craneal (N. VI) e inervan el músculo recto externo (RE). El tercer par craneal se indica como N. III.

dad eléctrica unitaria en el NMOE y de los movimientos oculares. El procedimiento experimental se ha descrito detalladamente en trabajos previos (10). Brevemente, bajo anestesia general (pentobarbital sódico, 35 mg/kg, i.p.) los animales se implantaron con electrodos bipolares de estimulación en el sexto par craneal de ambos lados y en el FLM derecho a nivel del NMOC, para la identificación mediante activación antidrómica de las motoneuronas y neuronas internucleares del NMOE (Figura 1). Dos bobinas de acero inoxidable

se suturaron a las escleróticas de ambos ojos para el registro de los movimientos oculares, de acuerdo con la técnica del seguimiento electromagnético de la posición ocular (19). Por último, se construyó una cámara de registro con cemento dental alrededor del orificio abierto en el hueso occipital. Tras una semana de recuperación se iniciaron las sesiones de registro. La duramadre se eliminó y la cámara de registro se protegió después de cada sesión con silicona estéril y cera de hueso artificial. Durante todo el período experimental se utilizaron salino fisiológico y antibióticos para mantener la esterilidad de la cámara.

Registro extracelular en el animal alerta

Los animales, inmovilizados mediante vendaje, se fijaron a la mesa de registro en el centro del campo electromagnético utilizado para medir los movimientos oculares. Como electrodos de registro se utilizaron micropipetas de vidrio llenas de una solución de ClNa 2M. Con ayuda de un micromanipulador, el electrodo se dirigió hacia el NMOE, donde se realizaron los registros unitarios en simultaneidad con el registro de los movimientos oculares (espontáneos e inducidos vestibularmente mediante rotación de la mesa alrededor del eje vertical).

La actividad eléctrica neuronal, el movimiento de la mesa y el de ambos ojos se almacenaron en un ordenador para su posterior análisis. La frecuencia de disparo (FD) de estas neuronas correlaciona con la posición (P) y la velocidad (V) ocular según la ecuación $FD = F_0 + k \cdot P + r \cdot V$, donde k y r representan la sensibilidad neuronal a la posición y a la velocidad ocular, respectivamente, y F_0 es la frecuencia de disparo en la posición cero (mirada central) (16). Para el cálculo de estos parámetros se utilizó el método de la regresión lineal múltiple entre la frecuencia de disparo neuronal y la posición y velocidad ocular. Los datos obtenidos se compararon estadísticamente con datos de animales controles y axotomizados de experimentos previos (13) (test ANOVA).

Marcaje anterógrado con biocitina y procesado para microscopía electrónica

Tras finalizar las sesiones de registro (tres meses), los animales se prepararon para el marcaje anterógrado de los axones seccionados de las neuronas internucleares del NMOE, con el objeto de comprobar el grado de crecimiento axonal y de reinervación dentro del trasplante. Para ello se

inyectó biocitina (al 3% en tampón Tris-HCl 0,05 M, pH 7,6, y ClNa 0,05 M) como trazador anterógrado en ambos NMOEs (9, 20). El marcador se inyectó iontoforéticamente aplicando pulsos positivos de 7 μ A de corriente durante 30 minutos a través de una micropipeta de vidrio. Tras 24 horas se procedió a perfundir transcardialmente al animal bajo anestesia profunda (pentobarbital sódico, 50 mg/kg, i.p.), con salino fisiológico seguido de fijador compuesto de 3% de paraformaldehído y 1,25% de glutaraldehído en 0,1 M de tampón fosfato, pH 7,4.

El troncoencéfalo se seccionó en cortes sagitales con ayuda de un vibratomo. La biocitina se reveló utilizando el complejo Avidina-Biotina-Peroxidasa (Vector Labs) seguido de una solución con diaminobenzidina al 0,05% y H₂O₂ al 0,01%. Tras el revelado, algunas secciones se procesaron para microscopía electrónica. Así, tras una postfijación en tetróxido de osmio al 1%, se tiñeron en bloque con acetato de uranilo al 2%, se deshidrataron y se incluyeron en plano en resina. Los cortes se analizaron, dibujaron y fotografiaron, tras lo cual se realizaron las secciones ultrafinas para su posterior observación en un microscopio electrónico.

Técnica inmunocitoquímica

Algunos cortes se reservaron para el procesamiento con técnicas inmunocitoquímicas contra calbindina, una proteína tamponadora de calcio que marca las células de Purkinje cerebelosas (21). Tras 45 minutos en una solución de bloqueo (suero normal de cabra al 7% diluido en tampón Tris-HCl 0,05 M, pH 7,4, con Triton X-100 al 0,1%), los cortes se incubaron 12 horas en el anticuerpo primario, un policlonal anti-calbindina de conejo diluido 1:6000. Tras varios lavados, se mantuvieron en el anticuerpo secundario (inmunoglobulina G biotinilada de cabra contra conejo) durante 90 minutos. Tras este período se revelaron siguiendo un procedimiento similar al utilizado en el caso de la biocitina. Una vez finalizada la tinción, los cortes se montaron, deshidrataron y se cubrieron con resina de montaje.

RESULTADOS

Axotomía de las neuronas internucleares del NMOE

La sección de los axones de las neuronas internucleares del NMOE se comprobó de tres ma-

neras diferentes. En primer lugar, se observaron los déficits oculomotores típicos de la oftalmoplejía internuclear anterior, un síndrome que afecta principalmente a los movimientos horizontales conjugados provocando incapacidad de adducción (22, 23). En segundo lugar, la ausencia de activación antidrómica en los registros del NMOE tras la estimulación eléctrica desde el electrodo situado en el FLM próximo al NMOC fue una prueba electrofisiológica de la interrupción del fascículo. En tercer lugar, en los cortes sagitales de troncoencéfalo se observó la sección completa del FLM.

Desarrollo del trasplante

El examen histológico mostró que el tejido embrionario se implantó con éxito en el lugar de la lesión, alcanzando un volumen de unos 6 μ l. El implante se distinguió fácilmente del tejido circundante gracias a la estructura cerebelosa que desarrolló, a pesar de ser un trasplante heterotópico, es decir, situado fuera de su localización natural.

La tinción inmunocitoquímica contra calbindina marcó específicamente las células de Purkinje del cerebelo trasplantado, lo que permitió caracterizar la estructura intrínseca del trasplante. Así, se comprobó que el cerebelo trasplantado mostró una anatomía similar a la de un cerebelo adulto con la presencia de lóbulos (corteza cerebelosa) y una sustancia blanca profunda (Figura 2A). Las células de Purkinje mostraron la ordenación de sus somas en una única capa, y se distinguieron las tres capas características de un cerebelo adulto: capa molecular, capa de las células de Purkinje y capa de las células de los granos (Figura 2A, C). La Figura 2B ilustra el aspecto típico de un cerebelo control teñido inmunocitoquímicamente contra calbindina; así se observa el marcaje selectivo de las células de Purkinje, la ordenación de sus somas y la disposición planar de sus árboles dendríticos en la capa molecular. La Figura 2C muestra el mismo tipo de tinción realizada en el trasplante, comprobándose el alto grado de similitud con la situación control. Los axones de las células de Purkinje discurrieron por la sustancia blanca del trasplante (Figura 2C). Por último, se distinguieron células de gran tamaño calbindina-inmunonegativas, rodeadas de terminales calbindina-inmunopositivos (posiblemente procedentes de las células de Purkinje) y agrupadas en una determinada zona del implante. Dichas células se caracterizaron como neuronas de los núcleos profundos del cerebelo.

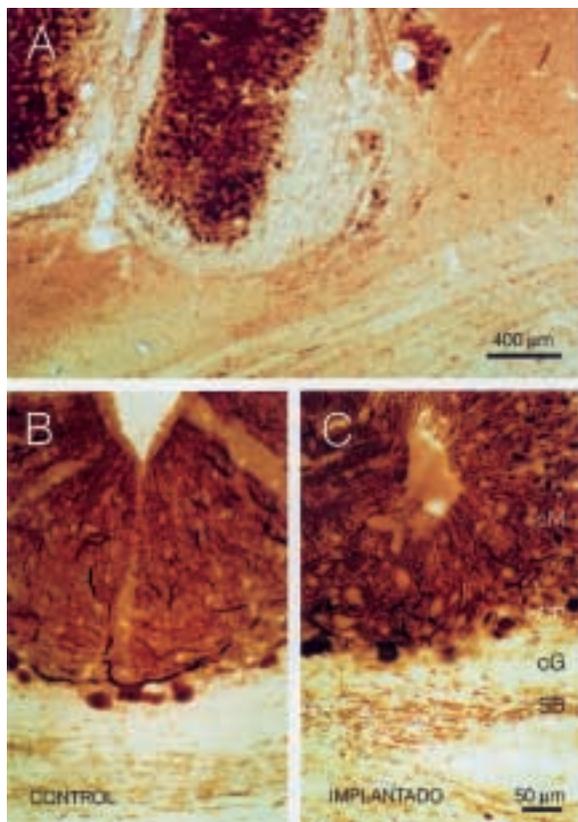


Figura 2. Fotomicrografías ilustrando secciones del cerebelo implantado e inmunoteñidas contra calbindina. El anticuerpo marca específicamente las células de Purkinje. Nótese en (A) la presencia de lóbulos y la delimitación de corteza y sustancia blanca, indicando que el cerebelo implantado desarrolló una citoarquitectura normal. Las fotomicrografías en (B) y (C) muestran dos imágenes de corteza cerebelosa obtenidas de un cerebelo control (B) y del implante (C). Puede observarse como el cerebelo implantado desarrolló las tres capas típicas de un cerebelo adulto: capa molecular (cM), capa de las células de Purkinje (cCP) y capa de las células de los granos (cG). SB indica sustancia blanca.

Crecimiento axonal y reinervación del trasplante

El marcaje anterógrado con biocitina se utilizó para evaluar el grado de inervación del trasplante. Los axones marcados con biocitina penetraron en el cerebelo trasplantado, donde se ramificaron profusamente emitiendo ramas colaterales. En la Figura 3A se ilustra una de estas ramificaciones terminales formada a partir del cabo distal de un axón seccionado; en este caso, el axón se ramificó en la capa molecular y en la capa de las células de Purkinje. Estos rebrotes axonales se caracterizaron por la presencia de engrosamientos a

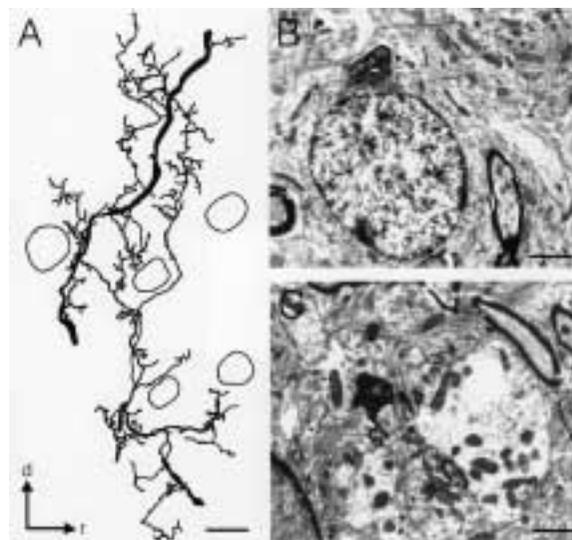


Figura 3. Crecimiento axonal y reinervación del implante. (A) Reconstrucción a cámara lúcida de una rama axónica terminal procedente de una neurona internuclear del NMOE marcada anterógradamente con biocitina. Nótese como tras la axotomía, los cabos proximales de los axones crecieron y se ramificaron dentro del implante. Los perfiles de las células de Purkinje se indican en el dibujo. Dorsal y rostral se indican como d y r, respectivamente. (B, C) Micrografías electrónicas ilustrando dos botones marcados con biocitina y localizados en la capa de la célula de los granos (B) y en la capa molecular (C) del implante. Las barras de calibración corresponden a 30 mm (A), 3 mm (B) y 1 mm (C).

modo de botones sinápticos. Hubo ramificaciones axonales en las tres capas del cerebelo trasplantado, aunque mayoritariamente se distribuyeron en la capa de las células de los granos y en la molecular, con escasos terminales en la capa de las células de Purkinje. Se observó que los axones que penetraron en el trasplante cursaron, en general, por la sustancia blanca intrínseca al trasplante, desde donde invadieron la capa de las células de los granos. Desde aquí, algunos axones continuaron hacia la capa molecular. No se observó ningún axón que penetrara directamente en la capa molecular, o que tras atravesarla volviera a la capa de las células de los granos.

Mediante microscopía electrónica se comprobó que estos engrosamientos efectivamente correspondían a botones sinápticos. Se observaron botones marcados tanto en la capa de las células de los granos (Figura 3B) como en la capa molecular (Figura 3C). Estos botones establecieron sinapsis preferentemente del tipo axodendrítico con las neuronas del trasplante. En ningún caso los axones marcados formaron fibras musgosas (con

los característicos glomérulos) ni fibras trepadoras, que son las dos entradas típicas al cerebelo (24), sino que desarrollaron una morfología similar a la de la proyección original, es decir, sobre las motoneuronas del NMOE (25).

Propiedades de disparo de las neuronas internucleares del NMOE tras el implante

Los registros comenzaron dos semanas después de la cirugía (axotomía e implante) y se prolongaron durante tres meses. Se registró la actividad de disparo de las neuronas internucleares durante movimientos oculares espontáneos e inducidos vestibularmente.

En la situación control, las neuronas internucleares presentan una frecuencia de disparo que correlaciona estrechamente con los movimientos oculares en el plano horizontal (Figura 4A). Como se ha descrito previamente (10, 16), estas neuronas son tónico-fásicas. Así, presentan un descarga tónica proporcional a la posición, con una tasa de disparo que incrementa con sucesivas posiciones del ojo homolateral al sitio de registro en la dirección temporal, y decreta en la dirección opuesta. Igualmente, presentan una señal de velocidad: durante movimientos oculares rápidos (sacádicos) en la dirección de activación disparan un brote de potenciales de acción de alta frecuencia (Figura 4A; línea vertical a trazos), mientras que cesan el disparo durante sacádicos en la dirección de inactivación (Figura 4A; línea punteada).

La axotomía produce cambios notables en el patrón de disparo de estas neuronas (13). La tasa de disparo de una neurona axotomizada desciende por debajo de los niveles normales para cualquier posición y velocidad del ojo (Figura 4B). Además, hay una pérdida de las señales de posición y velocidad ocular, de modo que las neuronas modulan menos en relación al movimiento ocular. Por ejemplo, durante los sacádicos en la dirección de activación no aparecen brotes de potenciales de acción de alta frecuencia, sino tan sólo un pequeño incremento en la frecuencia de disparo (Figura 4B; asterisco). Sin embargo, el implante, que significa la provisión de una nueva diana, supuso la recuperación de las propiedades de disparo. Así, las neuronas internucleares registradas en los experimentos de axotomía e implante presentaron un patrón de disparo tónico-fásico similar al control, volviendo a mostrar una fuerte modulación del disparo en relación a los movimientos oculares (Figura 4C). Se recuperó claramente la señal fásica para el movimiento, con brotes abruptos (Figura 4C; línea vertical a trazos)

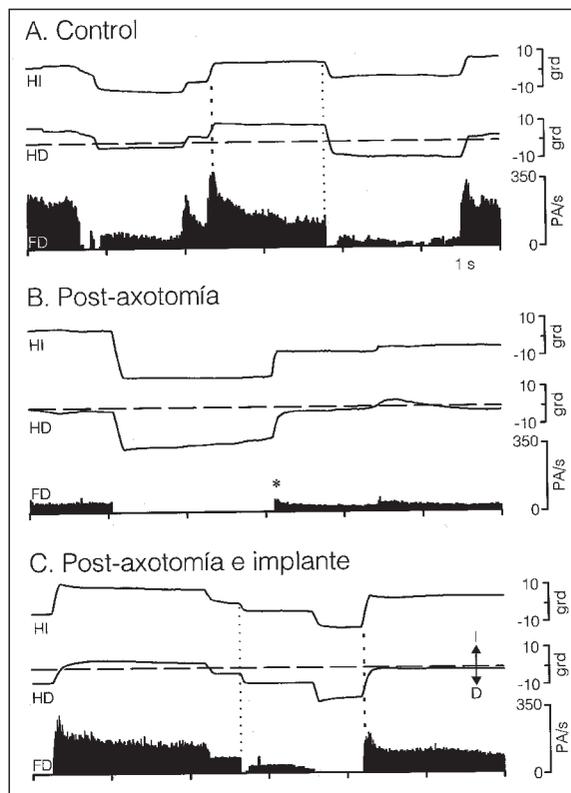


Figura 4. Actividad de disparo de tres neuronas internucleares registradas en el NMOE izquierdo en la situación control (A), 5 días tras la axotomía (B) y 11 días tras la axotomía más implante (C). Cada panel contiene, de arriba abajo, la posición horizontal del ojo izquierdo (HI), la del ojo derecho (HD) y la frecuencia de disparo de la neurona (FD). La FD de la neurona control creció proporcionalmente conforme el ojo se situó hacia la izquierda (I; dirección de activación) y decreció hacia la derecha (D). También mostró una señal fásica, en forma de brotes de potenciales de acción de alta frecuencia durante los movimientos sacádicos en la dirección de activación (línea vertical a trazos) y una pausa para aquéllos en la dirección de inactivación (línea punteada). Tras la axotomía (B) hubo una disminución general en la FD, desaparecieron los brotes y, en su lugar, sólo se observó un débil incremento en la FD (asterisco). Sin embargo, el patrón de disparo se restableció tras proveer a las neuronas axotomizadas de una nueva diana mediante el implante (C). Nótese el aumento general de la FD y el restablecimiento de los brotes (línea vertical a trazos) y las pausas (línea punteada) durante los movimientos sacádicos.

y pausas (Figura 4C; línea punteada) según la dirección del movimiento, así como la tasa de disparo tónica propia de cada posición.

Para cuantificar estos cambios, se calculó la sensibilidad neuronal a la posición (parámetro k) y a la velocidad ocular (parámetro r) en las distintas situaciones: control, axotomía y axotomía más

implante. Estos parámetros se obtuvieron, para cada neurona, como los coeficientes de la regresión lineal múltiple calculada entre la frecuencia de disparo y la posición y la velocidad ocular (ver ecuación en Métodos). Se computaron estos parámetros tanto durante movimientos oculares espontáneos (parámetros k_s y r_s) como durante aquellos inducidos vestibularmente, es decir, durante el reflejo vestibular (parámetros k_v y r_v); los tamaños de muestra variaron entre 23 y 28. Durante movimientos oculares espontáneos, las neuronas controles mostraron un valor medio de k_s de $6,4 \pm 1,5$ potenciales de acción/segundo/grado (media \pm desviación típica) y un valor medio de r_s de $1,5 \pm 0,5$ potenciales de acción/segundo/grado/segundo (Tabla I). Estos valores se redujeron en un 60% tras la axotomía, siendo la diferencia significativa respecto del control ($p < 0,05$; test ANOVA). Sin embargo, en el grupo de neuronas registradas tras el implante se obtuvieron valores de k_s y r_s similares a los controles (Tabla I). Respecto del parámetro F_0 (frecuencia de disparo en la posición central) se obtuvieron resultados similares. Así, mientras en las neuronas controles el valor medio de F_0 fue de $62,2 \pm 20,8$ potenciales de acción/segundo, la axotomía produjo una reducción significativa ($p < 0,05$; test ANOVA) de este parámetro, que retornó a valores normales tras el implante. Durante el reflejo vestibulo-ocular, las neuronas axotomizadas mostraron alteraciones similares a las descritas durante movimientos oculares espontáneos. Dichas alteraciones también se recuperaron tras el implante (Tabla I).

DISCUSIÓN

Los experimentos presentes demuestran que las propiedades de disparo de neuronas del sis-

tema nervioso central, alteradas como consecuencia de la axotomía, revierten cuando se promueve la reinervación de una nueva diana mediante implante de tejido nervioso embrionario. En particular, el trasplante de cerebelo embrionario utilizado mostró un alto grado de integración y desarrollo dentro del troncoencéfalo del huésped, siendo invadido por los axones seccionados del fascículo, que contactaron con las neuronas transplantadas. Por tanto, estos datos sugieren que el establecimiento de conexiones sinápticas con una nueva diana desempeña un papel fundamental en la recuperación de las propiedades de disparo de neuronas axotomizadas, aun cuando la diana es distinta a la original.

Diferenciación del trasplante

Los implantes crecieron aproximadamente al doble de su volumen original, desarrollándose de forma similar a un cerebelo: lobulación de una corteza cerebelosa con sustancia blanca separando los lóbulos y un área al margen de estos lóbulos que contiene células de gran tamaño, que se identificaron como células de los núcleos profundos del cerebelo. Además, la corteza desarrolló la típica estructura trilaminar: capa de las células de los granos, capa de las células de Purkinje y capa molecular (24). Las células de Purkinje (identificadas por el marcaje inmunocitoquímico contra calbindina) se dispusieron en monocapa y con un árbol dendrítico planar. Todas estas observaciones demuestran el alto grado de crecimiento y desarrollo alcanzado por el primordio cerebeloso trasplantado incluso ectópicamente. Estos datos refuerzan la idea de que el sistema nervioso central lesionado tiene una alta capacidad de integrar elementos celulares atípicos, como han indicado trabajos previos (14, 26). Por

TABLA I. Variaciones en la sensibilidad neuronal a los movimientos oculares tras la axotomía y recuperación tras la adición de una nueva diana

Grupo experimental	Movimientos espontáneos		Reflejo vestibulo-ocular	
	Sensibilidad a la posición (k_s)	Sensibilidad a la velocidad (r_s)	Sensibilidad a la posición (k_s)	Sensibilidad a la velocidad (r_s)
Control	$6,4 \pm 1,5$	$1,5 \pm 0,5$	$9,4 \pm 2,7$	$1,9 \pm 1,0$
Axotomía	$2,6 \pm 1,4^*$	$0,6 \pm 0,2^*$	$4,5 \pm 2,2^*$	$0,9 \pm 0,4^*$
Axotomía + implante	$6,7 \pm 0,9$	$1,7 \pm 0,5$	$11,1 \pm 5,6$	$2,5 \pm 2,2$

Los números corresponden al valor medio \pm la desviación típica. El número de neuronas analizadas en cada caso varió entre 23 y 28. Los asteriscos indican diferencias significativas con respecto al grupo control ($p < 0,05$; test ANOVA).

ejemplo, se ha demostrado que cuando se trasplanta cerebelo embrionario en el cerebelo del ratón mutante *pcd* (carente de sus células de Purkinje), se produce una migración selectiva de las células de Purkinje desde el trasplante hacia el dominio propio en la corteza cerebelosa del huésped, y además estas células de Purkinje reciben aferencias de las fibras trepadoras del huésped, estableciéndose sinapsis funcionales (27). Además del cerebelo, otras estructuras de tejido nervioso embrionario han sido también trasplantadas con éxito, como la médula espinal (28), el tálamo (29), el hipocampo (30) o el estriado (31).

Crecimiento de los axones en el implante

A diferencia del sistema nervioso periférico, los axones seccionados en el sistema nervioso central no muestran regeneración espontánea. Se ha comprobado que, al menos en parte, esta respuesta diferencial se debe a la distinta influencia de las células gliales. Así, mientras que las células de Schwann del sistema nervioso periférico promueven el crecimiento axonal tras una lesión (32), las células gliales del sistema nervioso central (oligodendrocitos, astrocitos y microglía) constituyen un sustrato inhibitorio para la regeneración (33).

En el sistema oculomotor se ha observado que los axones de las neuronas internucleares del NMOE no atraviesan la cicatriz glial formada por astrocitos y microglía en el sitio de lesión (34). Sin embargo, en presencia del implante, estos axones fueron capaces de regenerar a través de la lesión, invadir el tejido trasplantado y crecer dentro ramificándose en forma de brotes axonales. Probablemente, factores tróficos liberados por el implante fueron capaces de reducir el efecto inhibitorio de la glía. De igual manera, en una amplia variedad de sistemas neuronales se ha comprobado que los implantes de tejido nervioso embrionario estimulan el crecimiento de los axones lesionados del huésped (28-31).

También se comprobó que los axones que penetraron el implante emitieron botones sinápticos que contactaron con neuronas del cerebelo trasplantado. Las sinapsis fueron mayoritariamente axodendríticas y se distribuyeron, en proporción similar, en la capa de las células de los granos y en la molecular. Ninguno de los botones marcados apareció formando un glomérulo, que es la forma típica en que acaban los terminales sinápticos aferentes a la capa de las células de los granos, y que se caracterizan por su gran tamaño y por contactar con múltiples elementos postsinápticos (24). Por el contrario, los botones marcados

presentaron una morfología similar a la de los botones que las neuronas internucleares forman normalmente sobre las motoneuronas del NMOE (25). Otros autores han encontrado, sin embargo, que la diana postsináptica influencia sustancialmente la forma de los botones aferentes, en experimentos en que se induce la formación de conexiones atípicas (35). Aun en estos casos, determinadas propiedades de los botones persisten como intrínsecas al elemento presináptico (35, 36). Por ello, sugerimos que el fenotipo sináptico está determinado por factores tanto presinápticos como postsinápticos, y que dependiendo de cada conexión en particular, la influencia pre- o postsináptica puede desempeñar un papel principal.

Recuperación del disparo neuronal

El patrón de disparo, alterado en las neuronas internucleares del NMOE como consecuencia de la axotomía, volvió a mostrar características normales cuando estas células, tras su axotomía, consiguieron restablecer conexiones sinápticas con una nueva diana. Las alteraciones de la actividad de disparo descritas tras la axotomía reflejan, al menos en parte, la retirada de terminales sinápticos aferentes sobre las neuronas axotomizadas (34). Se ha mostrado previamente que esta retirada de terminales aferentes se debe a la falta de factores neurotróficos procedentes de la diana como consecuencia de la interrupción del axón. Así, la administración exógena de factor de crecimiento nervioso revierte la depresión en la transmisión sináptica y la pérdida de botones sinápticos que la axotomía produce en neuronas del ganglio cervical superior (37) y en motoneuronas espinales (38). Por tanto, la recuperación del patrón de disparo (y, por tanto, de las entradas sinápticas) observada en las neuronas del NMOE tras la reinervación del implante posiblemente se deba a la disponibilidad de factores neurotróficos procedentes de esta nueva diana.

Otro resultado interesante se refiere al hecho de que la recuperación del patrón de disparo se produjo incluso cuando las neuronas axotomizadas reinervaron una diana no natural, esto es, tejido cerebeloso en lugar de motoneuronas oculomotoras. Estos datos indican ausencia de reespecificación en las propiedades de disparo por la nueva diana. De forma similar, otros autores han encontrado que motoneuronas del hipogloso forzadas a reinervar el músculo orbicularis oculi en el modelo de anastomosis hipogloso-facial no readaptan su disparo tras la conexión con esta nueva diana (39). También se ha comprobado que las

propiedades eléctricas de motoneuronas espinales se recuperan del estado de axotomía tras la regeneración de los axones motores en la piel (40). Sin embargo, otros autores han encontrado evidencias de reespecificación de las propiedades eléctricas dependiendo de la diana postsináptica. Así, experimentos de inervación cruzada de un músculo lento por un nervio motor fásico muestran cambios en las propiedades electrofisiológicas de la motoneurona (como velocidad de conducción axonal, resistencia de entrada y características de la posthiperpolarización) que indican influencia por el músculo inervado (41). En conjunto, todos estos datos hacen difícil generalizar acerca del papel regulador de la diana sobre las propiedades de disparo de las neuronas aferentes. De nuevo, parece que hay determinados sistemas en los que la nueva diana es capaz de modificar retrógradamente propiedades electrofisiológicas, mientras que en otros sistemas no ocurre reespecificación. Esta respuesta diferencial podría explicarse en función de si los factores neurotróficos (u otras señales moleculares) sintetizados por la nueva diana son similares o no a los de la diana original y, por tanto, tienen la capacidad o no de modificar la expresión normal de los canales iónicos en la membrana de la neurona inervante.

Agradecimientos

Este trabajo ha sido posible gracias a la financiación recibida por la Fundación MAPFRE Medicina. Los autores también desean agradecer al Servicio de Microscopía Electrónica de la Universidad de Sevilla por el uso de sus instalaciones.

BIBLIOGRAFÍA

- PURVES D. *Body and Brain. A trophic theory of neural connections*. Cambridge: Harvard University Press, 1990; 1.^a ed.
- CLARKE P G H. Neuron death in the developing avian isthmo-optic nucleus, and its relation to the establishment of functional circuitry. *J Neurobiol*, 1992; 23: 1140-1158.
- KUAN C-Y, ROTH K A, FLAVELL R A, RAKIC P. Mechanisms of programmed cell death in the developing brain. *Trends Neurosci*, 2000; 23: 291-297.
- OPPENHEIM R W. Cell death during development of the nervous system. *Annu Rev Neurosci*, 1991; 14: 453-501.
- BARDE Y-A. Trophic factors and neuronal survival. *Neuron*, 1989; 2: 1525-1534.
- LEVI-MONTALCINI R. Developmental neurobiology and the natural history of nerve growth factor. *Annu Rev Neurosci*, 1982; 5: 341-362.
- BOTHWELL M. Functional interactions of neurotrophins and neurotrophin receptors. *Annu Rev Neurosci*, 1995; 18: 223-253.
- CHAO M, CASACCIA-BONNEFIL P, CARTER B, CHITTKA A, KONG H, YOON S O. Neurotrophin receptors: mediators of life and death. *Brain Res Rev*, 1998; 26: 295-301.
- DE LA CRUZ R R, PASTOR A M, DELGADO-GARCÍA J M. Effects of target depletion on adult mammalian central neurons: morphological correlates. *Neuroscience*, 1994; 58: 59-79.
- DE LA CRUZ R R, PASTOR A M, DELGADO-GARCÍA J M. Effects of target depletion on adult mammalian central neurons: functional correlates. *Neuroscience*, 1994; 58: 81-97.
- NOTHIAS F, WICTORIN K, ISACSON O, BJÖRKLUND A, PESCHANSKI M. Morphological alteration of thalamic afferents in the excitotoxically lesioned striatum. *Brain Res*, 1988; 461: 349-354.
- SOFRONIEW M V, COOPER J D, SVENDSEN C N, CROSSMAN P, IP N Y, LINDSAY R M, et al. Atrophy but not death of adult septal cholinergic neurons after ablation of target capacity to produce mRNAs for NGF, BDNF, and NT3. *J Neurosci*, 1993; 13: 5263-5276.
- DE LA CRUZ R R, DELGADO-GARCÍA J M, PASTOR A M. Discharge characteristics of axotomized abducens internuclear neurons in the adult cat. *J Comp Neurol*, 2000; 427: 391-404.
- SLADEK J R, GASH D M. *Neural transplants. Development and Function*. New York: Plenum Press, 1984; 1.^a ed.
- DELGADO-GARCÍA J M, DEL POZO F, BAKER R. Behavior of neurons in the abducens nucleus of the alert cat-I. Motoneurons. *Neuroscience*, 1986; 17: 929-952.
- DELGADO-GARCÍA J M, DEL POZO F, BAKER R. Behavior of neurons in the abducens nucleus of the alert cat-II. Internuclear neurons. *Neuroscience*, 1986; 17: 953-973.
- BÜTTNER-ENNEVER J A. *Neuroanatomy of the Oculomotor System*. Amsterdam: Elsevier, 1988; 1.^a ed.
- BERMAN A L. *The brain stem of the cat. A cytoarchitectonic atlas with stereotaxic coordinates*. Madison: The University of Wisconsin Press, 1968; 1.^a ed.
- FUCHS A F, ROBINSON D A. A method for measuring horizontal and vertical eye movement chronically in the monkey. *J Appl Physiol*, 1966; 21: 1068-1070.
- IZZO P N. A note on the use of biocytin in anterograde tracing studies in the central nervous system: application at both light and electron microscopic level. *J Neurosci Meth*, 1991; 36: 155-166.
- CELIO M R. Calbindin D-28k and parvalbumin in the rat nervous system. *Neuroscience*, 1990; 35: 375-475.
- CHRISTOFF N, ANDERSON P J, NATHANSON M, BENDER M B. Problems in anatomic analysis of lesions of the median longitudinal fasciculus. *Arch Neurol*, 1960; 2: 293-304.
- CARPENTER M B, MCMASTERS R E. Disturbances of conjugate horizontal eye movements in the monkey. II. Physiological effects and anatomical degeneration resulting from lesions in the medial longitudinal fasciculus. *Arch Neurol*, 1963; 8: 17-38.

24. LLINÁS R R, WALTON K D. Cerebellum. En: G M Shepherd (ed), *The Synaptic Organization of the Brain*. New York: Oxford University Press; 1998; 4.^a ed, 255-288.
 25. NGUYEN L T, BAKER R, SPENCER R F. Abducens internuclear and ascending tract of Deiters inputs to medial rectus motoneurons in the cat oculomotor nucleus: synaptic organization. *J Comp Neurol*, 1999; 405: 141-159.
 26. ISACSON O, DEACON T. Neural transplantation studies reveal the brain's capacity for continuous reconstruction. *Trends Neurosci*, 1997; 20: 477-482.
 27. SOTELO C, ALVARADO-MALLART R M. The reconstruction of cerebellar circuits. *Trends Neurosci*, 1991; 14: 350-355.
 28. CLOWRY G, SIERADZAN K, VRBOVÁ G. Transplants of embryonic motoneurons to adult spinal cord: survival and innervation abilities. *Trends Neurosci*, 1991; 14: 355-357.
 29. PESCHANSKI M, ISACSON O. Fetal homotypic transplant in the excitotoxicity neuron-depleted thalamus: light microscopy. *J Comp Neurol*, 1988; 274: 449-463.
 30. KROMER L F, BJÖRKLUND A, STENEVI U. Innervation of embryonic hippocampal implants by regenerating axons of cholinergic septal neurons in the adult rat. *Brain Res*, 1980; 210: 153-171.
 31. CLARKE D J, DUNNETT S B, ISACSON O, SIRINATH-SINGHJI D J S, BJÖRKLUND A. Striatal grafts in rats with unilateral neostriatal lesions-I. Ultrastructural evidence of afferent synaptic inputs from the host nigrostriatal pathway. *Neuroscience*, 1988; 24: 791-801.
 32. JOHNSON E M, TANIUCHI M, DISTEFANO P S. Expression and possible function of nerve growth factor receptors on Schwann cells. *Trends Neurosci*, 1988; 11: 299-304.
 33. SCHWAB M E. Myelin-associated inhibitors of neurite growth and regeneration in the CNS. *Trends Neurosci*, 1990; 13: 452-456.
 34. PASTOR A M, DELGADO-GARCÍA J M, MARTÍNEZ-GUIJARRO F J, LÓPEZ-GARCÍA C, DE LA CRUZ R R. Response of abducens internuclear neurons to axotomy in the adult cat. *J Comp Neurol*, 2000; 427: 370-390.
 35. CAMPBELL G, FROST D O. Target-controlled differentiation of axon terminals and synaptic organization. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1987; 84: 6929-6933.
 36. BHIDE P G, FROST D O. Intrinsic determinants of retinal axon collateralization and arborization patterns. *J Comp Neurol*, 1999; 411: 119-129.
 37. NJÅ A, PURVES D. The effects of nerve growth factor and its antiserum on synapses in the superior cervical ganglion of the guinea pig. *J Physiol*, 1978; 277: 53-75.
 38. MIYATA Y, KASHIHARA Y, HOMMA S, KUNO M. Effects of nerve growth factor on the survival and synaptic function of Ia sensory neurons axotomized in neonatal rats. *J Neurosci*, 1986; 6: 2012-2018.
 39. GRUART A, GUNKEL A, NEISS W F, ANGELOV D N, STENNERT E, DELGADO-GARCÍA J M. Changes in eye blink responses following hypoglossal-facial anastomosis in the cat: evidence of adult mammal motoneuron unadaptability to new motor tasks. *Neuroscience*, 1996; 73: 233-247.
 40. NISHIMURA H, JOHNSON R D, MUNSON J B. Rescue of motoneurons from the axotomized state by regeneration into a sensory nerve in cats. *J Neurophysiol*, 1991; 66: 1462-1470.
 41. FOEHRING R C, SYPERT G W, MUNSON J B. Motor unit properties following cross-reinnervation of cat lateral gastrocnemius and soleus muscles with medial gastrocnemius nerve. II. Influence of muscle on motoneurons. *J Neurophysiol*, 1987; 57: 1227-1245.
-