



Facultad de Biología

Departamento de Fisiología

TESIS DOCTORAL

**Implante de progenitores neurales en un modelo de lesión del sistema
oculomotor**

Camilo José Morado Díaz

Sevilla, 2015



ÁNGEL M. PASTOR, Catedrático del Dpto. de Fisiología de la Facultad de Biología, Universidad de Sevilla.

ESPERANZA R. MATARREDONA, Profesora Titular del Dpto. de Fisiología de la Facultad de Biología, Universidad de Sevilla.

ROSA R. DE LA CRUZ, Profesora Titular del Dpto. de Fisiología de la Facultad de Biología, Universidad de Sevilla.

CERTIFICAN:

Que D. Camilo José Morado Díaz, Licenciado en Biología por la Universidad de Sevilla, ha realizado bajo su dirección y supervisión el trabajo titulado “Implante de progenitores neurales en un modelo de lesión del sistema oculomotor”, considerando que reúne todas las condiciones necesarias para ser presentado y defendido como Tesis Doctoral.

Sevilla, 2 de Septiembre de 2015.

Fdo: Ángel M. Pastor

Fdo: Esperanza R. Matarredona

Fdo: Rosa R. de la Cruz

“El conocimiento es como el plano de una ciudad: una vez lo despliegas para consultarlo, ya no eres capaz de plegarlo de nuevo, de retornar de nuevo a la ignorancia, y el plano queda, sin remedio y para siempre, mal doblado y abultando más de lo que debiera. Es un engorro, ciertamente, pero tiene su utilidad”

Miguel Brieva

AGRADECIMIENTOS

Agradecimientos a las entidades financiadoras e instituciones:

- Esta tesis ha sido realizada gracias al apoyo económico de la Junta de Andalucía mediante una Beca Predoctoral adscrita al Proyecto de Investigación de Excelencia CVI-6053.
- Los experimentos incluidos en la presente tesis doctoral se han realizado en el Departamento de Fisiología de la Universidad de Sevilla, así como en los Departamentos de Biología y Microscopía del Centro de Investigación, Tecnología e Innovación de la Universidad de Sevilla (CITIUS).

Agradecimientos personales:

Todos somos en parte resultado de lo que nuestros maestros lograron inculcarnos. Sin ellos y su esfuerzo, no podría haber realizado este trabajo. En primer lugar, he de dirigirme a los más implicados en este proyecto, mis directores de tesis.

Gracias, Ángel por mantenerme siempre enfocado, enseñarme en qué consiste el mundo de la ciencia y lo duro a la par que reconfortante que es, por ser un trabajador inagotable y estar siempre ahí, en la base de ese mundo, sosteniéndonos a todos.

Gracias, Espe, modelo de profesionalidad, pulcritud, rectitud, cariño y buen humor. Su guía ha resultado ser imprescindible para mi formación y el desarrollo de este trabajo. Para mi eres un ejemplo que me motiva a seguir en esto (si existe alguien que lo disfruta tanto, no puede ser tan malo).

Gracias, Rosa. Sin tu ayuda y experiencia, nuestro grupo no existiría ni sería el que es. Superándote día tras día, nos ayudas de manera inestimable.

He tenido la enorme suerte de recibir clases y de aprender de mis compañeras de grupo Sara Morcuende y Beatriz Benítez. Personas de las más brillantes que me encontraré en mi vida. Me

han apoyado siempre, me han hecho reír y me han dado alguna colleja cuando me hizo falta (algunas literales). Gracias, “inmes”.

He de mencionar también a Rocío Muñoz, Paloma Duque, Rosendo García, Teresa Fuentes, Lourdes Acosta, Paula Martín, Silvia Silva, Lucía Cervantes, Álvaro Sánchez, Guillermo Moreno, Manuel Silva, Julio Torres y Rebeca Mejías, entusiastas compañeros de penas y amigos con un gran futuro. Gracias por escucharme y aconsejarme en los momentos más duros de estos años.

Le corresponde un lugar especial a Maya Davis. Ella me dio la mano cuando llegué al departamento y con ella aprendí la mayoría de lo que necesité para realizar esta tesis. Luego lo fuimos olvidando en parte a base de cerveza.

En mis últimos años de “fechorías” por el laboratorio, tuve una compinche especial. Alguien con quien descubrí nuevas propiedades nocivas del óxido de propileno, que los chistes malos no hacen gracia, pero con los pésimos se tiene uno que reír, y que para hablar un correcto inglés hay que gritar mucho. Ella me hace olvidar mi mal humor cada mañana y todos los miedos a los que pueda enfrentarme. Gracias por todo, Rocío.

Gracias a todos los miembros del Departamento de Fisiología, presentes y pasados, de entre los que debo destacar a José Luis Nieto, Livia Carrascal, Blas Torres, Luis Herrero, M^a Ángeles Luque y Alfonso Franco.

Pero la ciencia es también una forma de vida, es por ello que necesito hacer mención a todos los amigos que he tenido la suerte de ir encontrándome por el camino desde que me vine a estudiar a Sevilla. Afortunadamente, debido a su alto número, no puedo nombrarlos aquí a todos, no obstante tengo que dar las gracias a Juan Diego Fernández, Víctor García, Damián González, Antonio Moreno, Carlos Morales, Román González, Juan José García, Jesús Cambrollé, Jesús Domínguez, Patricia García, Cirenía Arias, Isa Ruiz, Antonio Álvarez, Paco Pérez, Irene Jiménez, Cristina Limón, José Manuel Monreal, Eduardo Villalobos,... por todos los buenos momentos que hemos pasado juntos.

Por último, pero no en orden de importancia, gracias a mi familia, a mis hermanos Antonio y Juan Carlos que me llenan el pecho de orgullo, a mi abuelo Camilo, y a todos los maestros que he tenido en mi vida. Dos de ellos fueron los primeros en poner un estricto empeño en mi formación sin olvidarse de darme todo el cariño que necesité. Gracias, mamá. Gracias, papá (allá donde estés). Va por vosotros.

ÍNDICE

INDICE

ABREVIATURAS.....	16
RESUMEN	18
INTRODUCCIÓN.....	19
1.1. El sistema oculomotor como modelo de estudio	22
Organización anatómica del sistema oculomotor.....	23
Movimientos oculares.....	28
1.1.2. Fisiología de las neuronas del NMOE	35
Axotomía del fascículo longitudinal medial	43
1.2.1. Alteraciones morfológicas debidas a la sección del fascículo longitudinal medial... 43	
1.2.2. Alteraciones motoras debidas a la sección del fascículo longitudinal medial	45
1.2.3. Alteraciones electrofisiológicas debidas a la sección del fascículo longitudinal medial	45
1.3. Factores neurotróficos	47
1.3.1. Superfamilia del TGF- β	48
1.3.2. Superfamilia de factores de crecimiento no neuronales	48
1.3.3. Neurotrofinas	48
1.3.4. Neuroquinas.....	51
1.4. Factores tróficos en el sistema oculomotor.....	52
1.5. Reacción glial a la lesión del sistema nervioso central	53
1.5.1. Astrocitos	54
1.5.2. Glía positiva a NG2	55
1.5.3. Oligodendrocitos.....	55
1.5.4. Microglía.....	55
1.5.5. Respuesta glial a la axotomía	56
1.6. Una nueva diana: células progenitoras neurales	58
1.6.1. Neurogénesis postnatal	58
1.6.2. Las células progenitoras neurales de la zona subventricular.....	59
1.6.3. Empleo de las células progenitoras neurales de la zona subventricular como una herramienta reparativa	61
OBJETIVOS.....	64
MATERIALES Y MÉTODOS.....	68

3.1. Animales.....	70
3.2. Preparación quirúrgica para el registro crónico de la actividad extracelular en el NMOE	71
3.3. Registros extracelulares	73
3.4. Adquisición de datos y análisis.....	76
3.5. Cultivo de progenitores neurales y transfección viral.....	78
3.6. Sección del fascículo longitudinal medial.....	79
3.7. Implante de progenitores neurales.....	80
3.8. Trazado anterógrado.....	80
3.9. Perfusión por vía transcardíaca.....	81
3.10. Procedimientos inmunohistoquímicos para microscopía confocal de fluorescencia....	81
3.11. Inmunocitoquímica en cultivos de neuroesferas.....	84
3.12. Hibridación <i>in situ</i> para la detección de ARNm de factores tróficos	84
3.13. Microscopía electrónica	85
3.14. Estadística.....	86
RESULTADOS	88
4.1. Multipotencialidad de los progenitores neurales	90
4.2. Interacción implante-hospedador.....	91
4.3. El implante de progenitores neurales previene las alteraciones en el disparo inducidas por la axotomía de las neuronas internucleares del NMOE	96
4.4. Alteraciones en el balance excitación-inhibición	103
4.5. Los implantes de progenitores neurales previenen la pérdida de aferencias sinápticas sobre las neuronas internucleares del NMOE.....	105
4.5. Evidencias ultraestructurales de la interacción implante-hospedador	109
DISCUSIÓN.....	114
5.1. Aislamiento y cultivo de progenitores neurales de la zona subventricular de gatos postnatales.....	116
5.2. Integración del implante de progenitores neurales en el tejido hospedador	117
5.3. Las células progenitoras neurales como una fuente de soporte trófico para las células lesionadas.....	118
5.4. Cambios en las aferencias excitadoras e inhibitoras a las neuronas internucleares del NMOE	123
CONCLUSIONES	128
BIBLIOGRAFÍA.....	132
APÉNDICE	155

ABREVIATURAS

aFGF: Factor ácido de crecimiento de fibroblastos

ATP: Trifosfato de adenosina

BDA: Biotina dextrano amina

BDNF: Factor neurotrófico derivado del cerebro

BMP: Proteína morfogenética del hueso

BO: Bulbo olfatorio

CMR: Corriente migratoria rostral

CNTF: Factor neurotrófico ciliar

CPNs: Células progenitoras neurales

DAB: 3, 3'-tetrahidroclorhidrato de diaminobencidina

EGF: Factor de crecimiento epidérmico

ELA: Esclerosis lateral amiotrófica

FD: Frecuencia de disparo

F₀: Frecuencia de disparo con la mirada al frente (a cero grados)

FGF: Factor de crecimiento de fibroblastos

FLM: Fascículo longitudinal medial

GDNF: Factor neurotrófico derivado de la glía

GFAP: Proteína glial fibrilar ácida

GFP: Proteína fluorescente verde

I: Corriente iónica

Ig: Inmunoglobulina

IGF: Factor de crecimiento parecido a la insulina

IL: Interleuquina

k: Sensibilidad neuronal a la posición ocular

LIF: Factor inhibidor de leucemia

mAb: Anticuerpo monoclonal

NBE: Neurona de brote excitatorio

NBI: Neurona de brote inhibitorio

NGF: Factor de crecimiento nervioso

NMOC: Núcleo motor ocular común

NMOE: Núcleo motor ocular externo

NP: Neuropilina

NT: Neurotrofina

P: Posición ocular

pa: Potencial de acción

pAb: Anticuerpo policlonal

PBS: Tampón fosfato salino

PIGF: Factor de crecimiento de la placenta

PPSE: Potencial postsináptico excitador

PPSI: Potencial postsináptico inhibitorio

PSA-NCAM: Molécula de adhesión celular neural polisializada

r: Sensibilidad neuronal a la velocidad ocular

SNC: Sistema Nervioso Central

TGF- β : Factor de crecimiento transformante β

TNF α : Factor de necrosis tumoral α

Trk: Tropomiosina quinasa

Um: Umbral de reclutamiento

V: Velocidad ocular

VEGF: Factor de crecimiento del endotelio vascular

VGAT: Transportador vesicular de GABA y glicina

VOR: Reflejo vestíbulo-ocular

VPF: Factor de permeabilidad vascular

ZSV: Zona subventricular

RESUMEN

El implante de células progenitoras neurales en el sistema nervioso central lesionado es una poderosa herramienta reparadora. Sin embargo, aún no se han evaluado extensamente los efectos de dichos implantes sobre el patrón de disparo y la sinaptología de las neuronas lesionadas. En este estudio se analizó si los progenitores neurales implantados en el sitio de lesión son capaces de restaurar las características de disparo y las aferencias sinápticas alteradas en las neuronas axotomizadas. Las células progenitoras neurales se aislaron de la zona subventricular de gatos postnatales y se implantaron en gatos adultos tras la transección del fascículo longitudinal medial. Esta lesión produce la axotomía de las neuronas internucleares del núcleo motor ocular externo (NMOE). Tras el implante, estas neuronas mostraron una recuperación completa del disparo tónico (sensibilidad neuronal a la posición ocular), pero un restablecimiento parcial del disparo fásico (sensibilidad neuronal a la velocidad ocular). El análisis por separado de los componentes excitatorio e inhibitorio de su disparo reveló una restitución completa de las señales inhibitorias, mientras que las excitatorias sólo se recuperaron parcialmente. Además, la cobertura sináptica de VGAT fue similar a la observada en neuronas internucleares control, indicando que las aferencias sinápticas inhibitoras se mantuvieron totalmente en los animales implantados. También se demostró que los axones dañados establecieron contactos sinápticos con las células progenitoras implantadas, la mayoría de las cuales fueron inmuno-positivas a VEGF (el factor trófico derivado del endotelio vascular) al mismo tiempo que las neuronas internucleares del NMOE expresaron Flk1, un receptor de VEGF. En conjunto, los resultados obtenidos sugieren que el soporte neurotrófico de VEGF podría estar implicado en el incremento del balance inhibición-excitación observado en los animales implantados. La recuperación casi total de las neuronas dañadas tras el implante indica que las células progenitoras neurales podrían ser una prometedora estrategia terapéutica tras esta lesión neuronal.

INTRODUCCIÓN

1. INTRODUCCIÓN

Los circuitos neuronales se conciben típicamente como proveedores unidireccionales de un flujo de información en forma de potenciales de acción, desde las neuronas aferentes hasta sus dianas, ya sean estas otras neuronas, fibras musculares o glándulas. Sin embargo, existe un flujo de información de igual importancia que discurre en dirección opuesta en forma de factores derivados de la diana, es decir, retrógradamente desde el tejido contactado hacia las células inervantes (Chao, 2003; Rind y col., 2005). Siempre que se interrumpe el soporte trófico entre células conectadas, aparecen diversos efectos deletéreos que pueden incluir desde la muerte celular, a un amplio rango de cambios metabólicos y electrofisiológicos que repercuten en las propiedades sinápticas y de disparo de las neuronas (Titmus y Faber, 1990). Estas alteraciones pueden ser revertidas en cierta medida cuando se suministra una nueva diana (de la Cruz y col., 1996; Benítez-Temiño y col., 2005; Navarro y col., 2007). Es más, la administración independiente de factores derivados de las dianas neuronales aplicados al extremo de sus axones seccionados, regula selectivamente sus propiedades de disparo tónico y fásico (Davis-López de Carrizosa y col., 2009). Por tanto, la diana es un potente regulador fenotípico de la neurona inervante (Park y Poo, 2013).

Para probar este concepto, en este trabajo se planteó el aporte de células progenitoras neurales en la localización de una lesión central realizada en el fascículo longitudinal medial (FLM), puesto que estas células poseen potencialmente la capacidad de integrarse cerca de los extremos de las neuronas lesionadas del tejido hospedador (Cusimano y col., 2012; Fargelund y col., 2012), así como la posibilidad de suministrar factores tróficos como el factor de crecimiento nervioso (NGF), el factor de crecimiento derivado del cerebro (BDNF), la neurotrofina 3 (NT-3) y el factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF; Tonchev y col., 2007). La acción sinaptotrófica de estas sustancias les permite modificar características sinápticas y de disparo de neuronas tras su administración (Zhou y col., 2005; Boyce y col., 2012). La sección del FLM permite la afección de una población neuronal bien definida y localizada en un circuito troncoencefálico dedicado al control oculomotor, las neuronas internucleares del núcleo motor ocular externo (NOME; Delgado-García y col., 1986b), lo que convierte a este modelo en una herramienta de estudio de gran utilidad. En trabajos previos de este grupo, se demostró que las neuronas internucleares del NMOE axotomizadas sobreviven a la transección de su axón al lesionar el FLM, pero sufren una serie de modificaciones duraderas de su actividad eléctrica y de sus aferencias sinápticas (de la Cruz y col., 2000), mientras se mantiene la ausencia de una diana (Pastor y col., 2000). Los hallazgos obtenidos en el presente trabajo indican que los progenitores

neurales son capaces de rescatar la mayoría de las propiedades de disparo y las aferencias de las neuronas axotomizadas, pero con un desbalance a favor de la inhibición. Los factores neurotróficos suministrados posiblemente por las células progenitoras neurales podrían estar actuando retrógradamente para modular la depresión sináptica y así mantener las propiedades de disparo de las neuronas lesionadas. Estos resultados estarían en consonancia con los efectos sinaptotróficos atribuidos a factores como el VEGF, el cual puede alterar el equilibrio entre la inhibición y la excitación.

1.1. El sistema oculomotor como modelo de estudio

Para asegurar una visión óptima, las imágenes deben ser mantenidas en la retina. Por esta razón, resulta esencial la existencia de un mecanismo que encuentre, enfoque, fije y siga el objeto de interés mientras nos movemos en nuestro entorno. La precisión de este sistema ha de ser extraordinaria, ya que un leve error de unos pocos grados nos haría percibir imágenes borrosas y deterioradas. El sistema oculomotor conserva estáticas las imágenes en la retina. Para ello, se vale de mecanismos que mantienen la mirada en una determinada posición, produciendo fijaciones oculares, y de movimientos sacádicos, rápidos desplazamientos de los ojos destinados a preservar la imagen en el entorno cercano de la fovea, la zona de mayor densidad de fotorreceptores de la retina. Estos procesos dependen del control coordinado de diferentes núcleos neuronales sobre los músculos extraoculares.

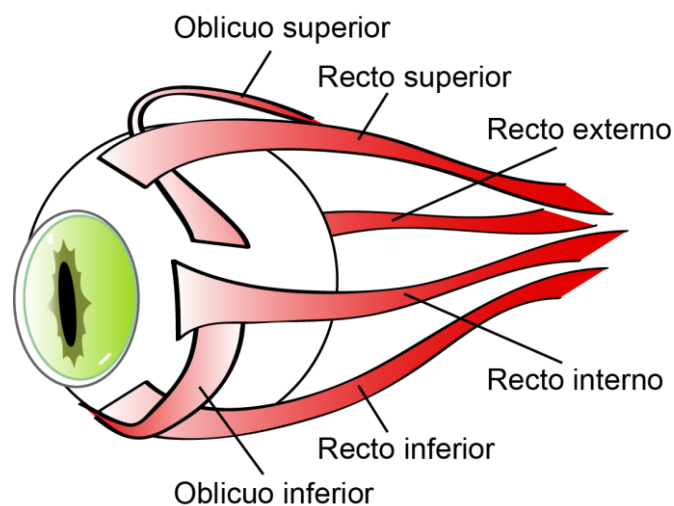


Figura 1. Músculos extraoculares. Ilustración representando los músculos que intervienen en los movimientos oculares. El dibujo muestra el ojo derecho desde una perspectiva nasal. Los músculos extraoculares se insertan en torno al globo ocular y están organizados en tres pares antagónicos: los músculos recto externo y recto interno permiten los movimientos oculares en el plano horizontal; los músculos recto superior y recto inferior ejecutan desplazamientos de la mirada en el plano vertical; los músculos oblicuo superior e inferior, insertados a unos 45 grados por encima y por debajo del músculo recto interno, respectivamente, permiten desplazamientos oculares torsionales en torno al eje antero-posterior. Su contracción y relajación coordinada permiten la ejecución de los distintos movimientos oculares.

Organización anatómica del sistema oculomotor

1.1.1.1. **Músculos extraoculares:** En torno al globo ocular se insertan tres pares de músculos antagonísticos entre sí cuyas contracciones y relajaciones ocurren de manera coordinada, permitiendo así los movimientos oculares en los distintos planos posibles (Figura 1). Los movimientos horizontales de los ojos se llevan a cabo por la actividad de los músculos recto interno y recto externo, insertados en la porción nasal y temporal del globo ocular, respectivamente. Los músculos recto superior e inferior producen los movimientos oculares verticales gracias a su unión en las zonas superior e inferior del ojo, respectivamente. También es posible realizar movimientos en torno al eje antero-posterior, gracias a los músculos oblicuo superior e inferior, insertados a unos 45 grados por encima y por debajo del músculo recto interno.

1.1.1.2. **Neuronas extraoculares:** La actividad de los músculos extraoculares está controlada por neuronas localizadas, en mamíferos, en tres núcleos del tronco del encéfalo (Figura 2).

- **Núcleo motor ocular común (NMOC):** se sitúa a nivel del tubérculo cuadrigémino superior. Contiene motoneuronas que inervan contralateralmente los músculos recto superior, y homolateralmente los músculos recto inferior, recto interno y oblicuo inferior. Estas motoneuronas se organizan en grupos que constituyen un mapa topográfico con un orden de distribución de rostral a caudal, localizándose en primer lugar las motoneuronas del recto inferior, seguidas de las del recto interno, oblicuo inferior y recto superior (Evinger, 1988). A su vez, las motoneuronas que inervan el músculo recto interno a través del III par craneal, constituyen tres subgrupos claramente definidos en primates (Büttner-Ennever, 2006) y más rudimentariamente en especies de menor tamaño como el gato (Miyazaki, 1985) y la rata. Las motoneuronas del grupo A se extienden ventralmente hacia el fascículo longitudinal medial (FLM), las del grupo B, las de mayor tamaño, se localizan en la región dorsolateral del NMOC, y las del grupo C, las más pequeñas, se encuentran en la zona periférica dorsomedial (Büttner-Ennever y Akert, 1981). Sus funciones específicas aún no están del todo establecidas, pero se ha sugerido que contactan diferencialmente con fibras musculares de inervación única o múltiple (Büttner-Ennever y col., 2001). Además, existe una población de neuronas internucleares que proyectan a través del FLM en dirección caudal hacia el núcleo motor ocular externo, cuya actividad se ha relacionado con la conjugación de los movimientos horizontales de los dos ojos (Mays y col., 1986).

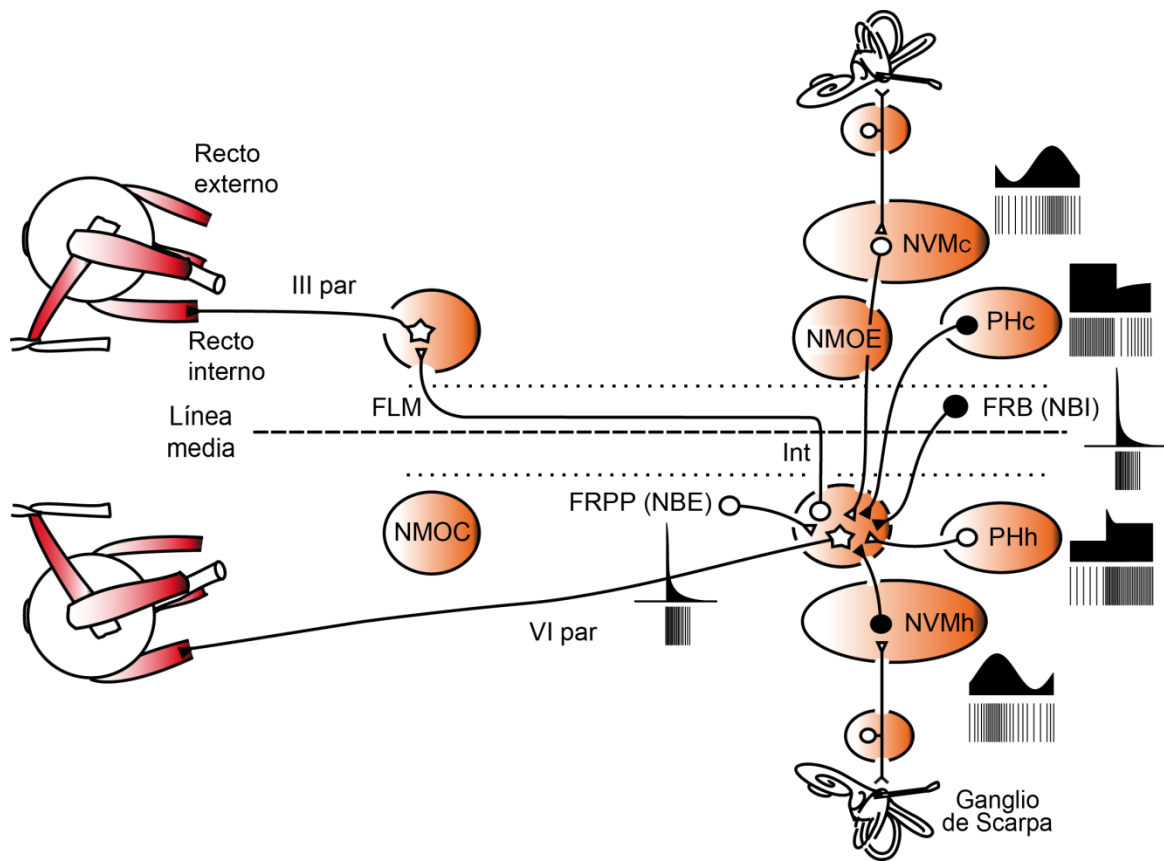


Figura 2. Circuito básico del sistema oculomotor responsable de los movimientos oculares horizontales. Ilustración mostrando los músculos que intervienen en los movimientos oculares horizontales (músculos recto externo y recto interno), junto a las motoneuronas (soma con forma estrellada) que controlan su actividad a través del VI par craneal (VI par) y del III par craneal (III par), cuyos somas se encuentran en los núcleos motor ocular externo (NMOE) y motor ocular común (NMOC), respectivamente. Las neuronas internucleares (Int, soma con forma circular), que participan en la coordinación de los movimientos horizontales de ambos ojos, proyectan desde el NMOE hacia el NMOC contralateral a través del fascículo longitudinal medial (FLM). Las principales aferencias que reciben las neuronas del NMOE proceden de: i) las neuronas de brote excitador (NBE) de la formación reticular paramediana pontina (FRPP) homolateral; ii) las neuronas de brote inhibitorio (NBI) de la formación reticular bulbar (FRB) contralateral; iii) las neuronas excitadoras contralaterales del núcleo vestibular medial (NVMc); iv) las neuronas inhibitorias homolaterales del núcleo vestibular medial (NVMh); v) las neuronas homolaterales excitadoras del núcleo prepositus hipoglossi (PHh); y vi) las neuronas inhibitorias contralaterales del núcleo prepositus hipoglossi (PHc). Se muestra también, de forma esquemática, la principal señal de disparo codificada por cada una de estas entradas al NMOE. Las neuronas y conexiones excitadoras se representan en color blanco, mientras que las inhibitorias en color negro. Adaptado de la tesis doctoral de González-Forero, 2002.

- **Núcleo troclear o patético:** Se encuentra en el tubérculo cuadrigémino inferior, inmediatamente caudal al NMOC y ventral al acueducto. Contiene motoneuronas que a través del IV par craneal inervan el músculo oblicuo superior contraeltral (el 96-98% de las motoneuronas) y homolateral (el 2-4%; Murphy y col., 1986).

- **Núcleo motor ocular externo (NMOE):** Ubicado en el puente dorsal, bajo el cuarto ventrículo y ventral a la rodilla del facial, contiene motoneuronas que proyectan sobre el músculo recto externo homolateral a través del VI par craneal, y neuronas internucleares que establecen contactos sinápticos con las motoneuronas del recto interno del NMOC contralateral, proyectando sus axones a través del FLM (Delgado-García y col., 1986b). En cuanto al número de motoneuronas y de neuronas internucleares, constituyen una razón 1:2, respectivamente (Steiger y Büttner-Ennever, 1978), distribuidas en el gato de manera entremezclada por todo el NMOE, existiendo una mayor prevalencia de neuronas internucleares en la porción rostral. La coordinación de los movimientos oculares horizontales ocurre en parte gracias a estas neuronas internucleares, ya que poseen un patrón de disparo similar al de las motoneuronas del recto externo y controlan la actividad del músculo agonista del otro ojo, el recto interno (Fuchs y col., 1988; Büttner-Ennever y Akert, 1981; Delgado-García y col., 1986b).

1.1.1.3. **Aferencias sinápticas al NMOE:** Las motoneuronas del recto externo comparten el origen de las aferencias que reciben con las neuronas internucleares, procediendo estas de los núcleos vestibulares (relacionadas con los movimientos lentos durante el reflejo véstíbulo-ocular), de la formación reticular (median los movimientos sacádicos) y del núcleo *prepositus hipoglossi* (determinan las fijaciones oculares; Escudero y Delgado-García, 1988).

- **Núcleo vestibular:** Ubicado en la protuberancia, lateral al NMOE, está constituido por un conjunto de subdivisiones (superior o de Bechterew, medial o triangular, lateral o de Deiters, descendente o inferior y el grupo Y) con diferencias anatómicas y funcionales. Proyectan sobre las motoneuronas específicas de los pares de músculos extraoculares a través de vías directas excitadoras e inhibitoras, de manera que cualquier rotación de la cabeza conduce a un patrón determinado de activación e inhibición muscular para producir un movimiento ocular compensatorio. Las señales que reciben las neuronas vestibulares proceden de neuronas bipolares del ganglio de Scarpa (conectado al canal semicircular horizontal), que proyectan hacia el troncoencéfalo a través del VIII par craneal, que en su porción ventral, conecta con las subdivisiones medial y lateral (McCrea y col., 1987). A través de estas aferencias, las neuronas del ganglio de Scarpa mandan potenciales de acción a una frecuencia proporcional a la velocidad de la cabeza en el plano horizontal, elevándose si el giro es en dirección homolateral y disminuyendo en dirección contralateral. Estas señales llegan tanto a las motoneuronas recto-mediales

del NMOE, como a las motoneuronas del recto interno en el NMOC, produciendo movimientos oculares. Las aferencias vestibulares al NMOE parten de la porción rostral de la subdivisión medial, zona donde se origina una señal relacionada con la velocidad ocular durante el reflejo vestibulo-ocular (VOR; ver sección 1.1.2.5). Estas proyecciones al NMOE son bilaterales, siendo la homolateral de carácter inhibitorio y la contralateral excitador (Baker y col., 1969; Broussard y col., 1995; Escudero y col., 1992).

Sin embargo, las neuronas vestibulares también transmiten información a los núcleos motores no sólo relacionada con el VOR, sino durante movimientos oculares espontáneos, presentando pausas en su actividad asociadas a movimientos rápidos y una débil señal de posición ocular. Es por ello que las neuronas vestibulares pueden ser clasificadas en cinco grupos en función de la naturaleza de la señal que codifiquen:

- **Grupo I:** Su señal es exclusivamente vestibular, puesto que son sensibles a la velocidad de la cabeza, pero no muestran modulación con los movimientos oculares individuales.
- **Grupo II:** Con señal vestibular y sacádica. Además de responder a la actividad vestibular, producen brotes o pausas durante los movimientos sacádicos.
- **Grupo III:** Poseen señal vestibular y de posición. Las neuronas de este grupo presentan sensibilidad a la posición ocular durante movimientos espontáneos de los ojos y a la velocidad de la cabeza acompañando a la estimulación vestibular. En este grupo se incluyen las neuronas de posición-velocidad-pausa, que se pausan durante los movimientos sacádicos (Escudero y de la Cruz, 1989).
- **Grupo IV:** Neuronas de la velocidad de la mirada que codifican velocidad ocular en el espacio. Algunas de las neuronas de este grupo, reciben aferencias del flóculo lateral del cerebelo, y están implicadas en la fase lenta de los movimientos oculares del reflejo vestibulo-ocular (Lisberger, 1994).
- **Grupo V:** Sensibles a los movimientos sacádicos y a la posición de los ojos (neuronas fásico-tónicas). Su patrón de disparo es similar al de una motoneurona ocular durante movimientos oculares espontáneos, aunque su actividad cambia durante la estimulación vestibular.

Las neuronas dorsales del **grupo Y** parecen poseer sensibilidad a la velocidad de la mirada en dirección vertical (Chubb y Fuchs, 1982). Proyectan monosinápticamente sobre el NMOC y reciben aferencias inhibitorias el flóculo del cerebelo (Partsalis y col., 1995a, b).

- **Formación reticular:** Las aferencias reticulares al NMOE proceden de dos áreas principales, la formación reticular pontina paramediana (en la que se distinguen a su vez dos núcleos reticulares pontinos, oral y caudal), y la formación reticular bulbar dorsomedial (contiene el núcleo paragigantocelular dorsal). La formación reticular pontina paramediana proyecta sobre el NMOE homolateral (Büttner-Ennever y Henn, 1976; Graybiel, 1977), estableciendo contactos sinápticos excitadores con las motoneuronas y las neuronas internucleares (Escudero y Delgado-García, 1988; Destombes y Rouvière, 1981; Grantyn y Grantyn, 1976; Igusa y col., 1980). Por lo tanto, su funcionalidad está relacionada con la ejecución de movimientos oculares rápidos dirigidos horizontalmente hacia el lado homolateral (Cohen y Komatsuzaki, 1972). En la formación pontina paramediana existen dos tipos de neuronas en base a sus propiedades fisiológicas, neuronas de brote excitador (NBE) y neuronas retículo-espinales. Las NBE producen brotes de potenciales de acción previos a la realización de un movimiento ocular rápido en la dirección homolateral y se mantienen mientras dura el movimiento. En cambio, permanecen en silencio durante movimientos rápidos contralaterales, movimientos lentos y fijaciones. Por lo tanto, estas neuronas son las responsables de la señal fásica de las neuronas del NMOE necesaria para la realización de movimientos oculares rápidos (revisado por Horn, 2006). Las neuronas retículo-espinales proyectan sobre la médula espinal a lo largo del tronco del encéfalo y reciben aferencias de los tubérculos cuadrigéminos, integrando señales relacionadas con los movimientos de cabeza y ojos realizados simultáneamente (Grantyn y col., 1980, 1987). La formación reticular bulbar inerva a las neuronas del NMOE contralateral estableciendo sinapsis inhibitorias (Destombes y Rouvière, 1981; Escudero y García-Delgado, 1988; Grantyn y col., 1980; Graybiel, 1977). Acompañando a los movimientos rápidos en la dirección homolateral, estas neuronas emiten brotes de potenciales de acción de alta frecuencia, lo que supone un incremento de su actividad durante movimientos contralaterales al NMOE que inervan, reduciendo la tasa de disparo de las neuronas de dicho NMOE. Es por ello que se las conoce como neuronas de brote inhibitorio (NBI; revisado por Horn, 2006).
- **Núcleo prepositus hipoglossi:** Se encuentra ubicado en el suelo del cuarto ventrículo, caudal al NMOE y rostral al hipogloso. Las neuronas de su porción más rostral emiten proyecciones bilaterales hacia el NMOE, siendo la rama homolateral excitadora, y la contralateral inhibitoria, codificando en su patrón de disparo señales relacionadas con la posición ocular (Escudero y col., 1992). Sin embargo, en este núcleo también existen

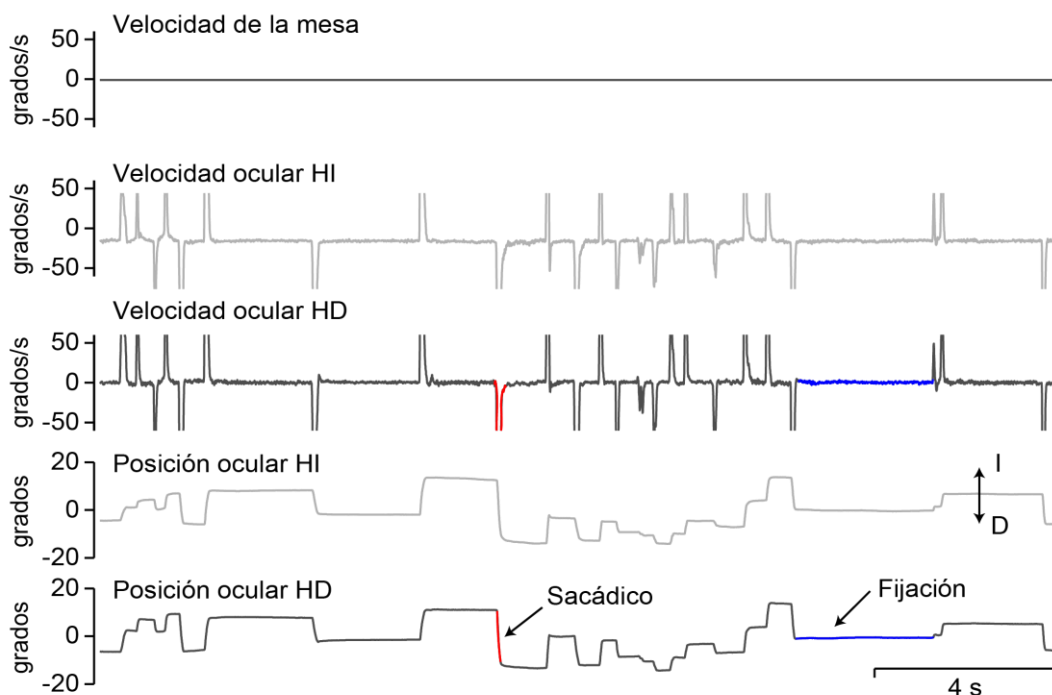
neuronas que codifican información de la velocidad de los movimientos oculares y otras que poseen una señal intermedia de velocidad y posición (Delgado-García y col., 1989). Por esta razón, se piensa que el prepositus hipoglossi participa en la integración de la posición ocular. Este núcleo recibe información de la velocidad ocular procedentes de la formación reticular y de los núcleos vestibulares, señales que emplearía para realizar una integración matemática y transformar la información de velocidad en señales de posición ocular (Fukushima y Kaneko, 1995).

- **Aferencias adicionales:** A las neuronas del NMOE llegan otras terminaciones nerviosas además de las principales ya señaladas: i) Aferencias procedentes de neuronas tecto-retículo-espinales de los tubérculos cuadrigéminos superiores, que proyectan colaterales hacia el NMOE y otros núcleos oculomotores, cuya actividad se ha relacionado con respuestas visuomotoras a estímulos en localizaciones espaciales específicas y con movimientos oculares rápidos dirigidos hacia los objetos de interés, por lo que se relacionan con la coordinación de los movimientos de los ojos, la cabeza y el cuerpo (Grantyn y Grantyn, 1982). ii) Procedente del utrículo del oído interno, llegan al NMOE unas aferencias excitadoras monosinápticas para integrar la señal de aceleración lineal utricular con la señal de movimiento procedente de los canales semicirculares en una rotación de la cabeza, facilitando la ejecución de un reflejo compensador (Uchino y col., 1994). iii) Finalmente, se ha descrito una proyección procedente de las neuronas internucleares del NMOC que conectan bilateralmente con el NMOE (de la Cruz y col., 1992), relacionada posiblemente con la generación de movimientos conjugados y de vergencia.

Movimientos oculares

Existen cinco tipos de movimientos oculares controlados de manera relativamente independiente por circuitos neuronales que parecen converger a nivel de la ruta eferente. Cada uno de estos movimientos está implicado en diferentes aspectos de estímulos sensoriales que precisan desplazamientos oculares de diferentes características temporales. Además de estas cinco clases de movimientos, también es necesario mantener una posición estable durante las fijaciones oculares en un punto concreto, requiriendo que ciertas estructuras neuronales supriman activamente cualquier movimiento.

A. Movimientos oculares espontáneos



B. Reflejo vestibulo-ocular

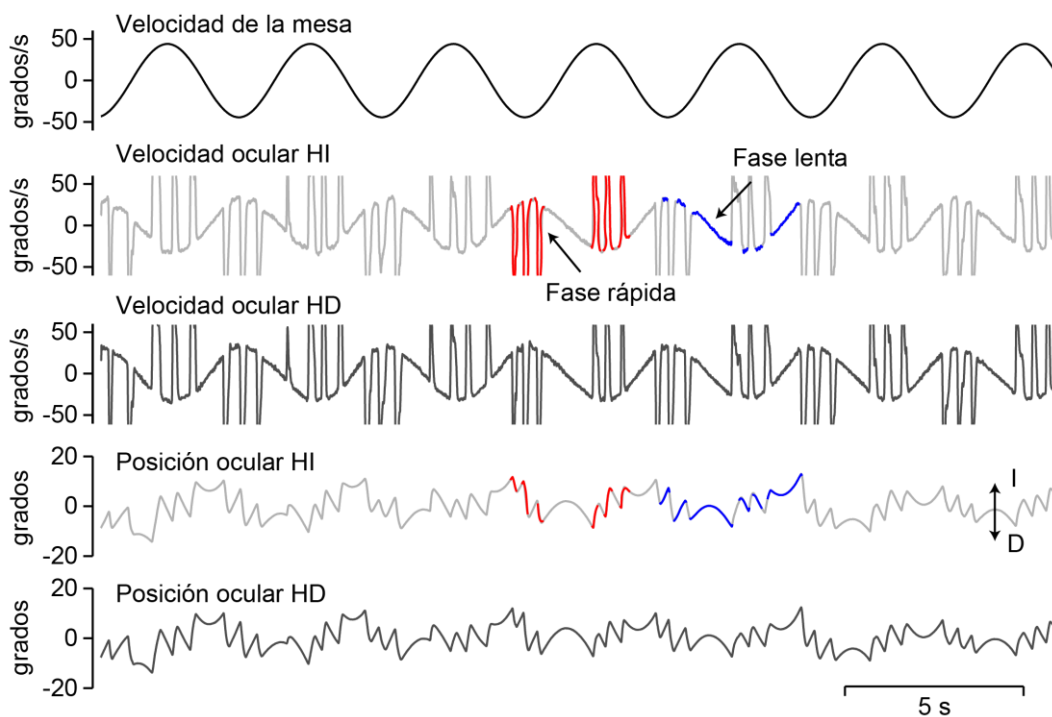


Figura 3. Movimientos oculares espontáneos e inducidos vestibularmente en el gato. **A**, Gráficos representando, desde arriba hacia abajo, la velocidad de la mesa de registro, la velocidad en el plano horizontal de los ojos izquierdo (HI) y derecho (HD), y su posición horizontal ocular. Los trazos hacia arriba y hacia abajo se corresponden con desplazamientos de los ojos hacia la izquierda (I) y hacia la derecha (D), respectivamente. Las flechas indican un ejemplo de un movimiento ocular rápido o sacádico (resaltado en rojo) y de una fijación (en color azul) durante movimientos oculares espontáneos. **B**, Movimientos oculares durante el reflejo vestibulo-ocular, con gráficos representando lo mismo que en **A**, pero en este caso, las flechas indican ejemplos de las fases rápida (en rojo) y lenta (en azul) de los ojos. Adaptado de la tesis doctoral de Davis-López de Carrizosa, 2010.

1.1.1.4. **Movimientos sacádicos:** Los sacádicos son movimientos oculares rápidos y conjugados destinados a situar la fovea en un punto de interés en la periferia del campo visual, provocando en consecuencia un desplazamiento de la mirada hasta una nueva posición. Los estímulos sensoriales que activan al sistema sacádico están relacionados con la distancia y la dirección de una imagen diana respecto a la posición actual de la mirada, siendo su latencia de 200 a 250 ms (Becker, 1989). Aunque los movimientos sacádicos pueden ser realizados voluntariamente, también se producen para resituar los ojos tras las fases rápidas del reflejo vestibular (Figura 3). Son varias las estructuras implicadas en la generación y el control de los sacádicos. Las órdenes para la ejecución de movimientos rápidos horizontales proceden de neuronas premotoras del puente del encéfalo (Scudder y col., 2002), mientras que el control de los movimientos verticales corresponde a neuronas rostrales mesencefálicas (Bhidayasiri y col., 2000). Además, hay estructuras superiores implicadas a este respecto en el colículo superior, el tálamo, el cerebelo y diferentes áreas de la corteza posterior y frontal (revisado por Lynch y Tian, 2006), controlando distintos tipos de sacádicos, como el colículo superior que regula sacádicos guiados visualmente o la corteza que media la realización de sacádicos intencionados. Todas estas estructuras superiores envían sus eferencias a los generadores premotores de movimientos sacádicos, la formación reticular pontina paramediana para los sacádicos horizontales, y el núcleo intersticial rostral del FLM para los sacádicos verticales y torsionales, ambos localizados en el tronco del encéfalo.

1.1.1.5. **Movimientos de seguimiento:** Este tipo de movimientos es necesario para asegurar una imagen clara en la fovea de un objeto que se desplaza lentamente. Es un mecanismo voluntario y únicamente ha sido descrito en animales foveados. Estos movimientos oculares se activan al desplazarse la imagen por la retina. El sistema debe ajustar de forma muy precisa la velocidad estimada del objeto, ya que la fovea cubre tan sólo dos grados de los campos visuales de cada ojo, siendo necesaria una respuesta motora apropiada. La latencia con la que se inician estos movimientos es generalmente menor que la de los sacádicos, en torno a 100-150 ms (Robinson, 1965), y en monos alcanzan velocidades mayores de 100 grados/s (Lisberger y col., 1981).

Normalmente, para captar un objeto en movimiento, se producen movimientos de la cabeza acompañando a los de los ojos. En dicha situación, es necesario suprimir el reflejo vestíbulo-ocular, un reflejo compensatorio que mueve los ojos a la misma velocidad que la cabeza pero en dirección contraria para mantener una visión clara.

Varios investigadores (Fukushima y col., 1999; Belton y McCrea, 2000) han sugerido que, en estas circunstancias, el sistema nervioso central genera señales oculares de seguimiento para cancelar este reflejo.

Se han encontrado neuronas premotoras con sensibilidad a la velocidad ocular durante la realización de movimientos de seguimiento en el área medial y en el grupo Y del núcleo vestibular (Roy y Cullen, 2003; Chubb y Fuchs, 1982). Estas neuronas proyectan sobre los núcleos motores y reciben aferencias del flóculo del cerebelo (Langer y col., 1985). Las neuronas del centro del área cortical temporal visual codifican velocidad y dirección de movimiento visual en su disparo, y se asocian al inicio de los movimientos de seguimiento, mientras que la región superior de esta área cortical se asocia al mantenimiento de estos movimientos (Krauzlis, 2004). Existen otras áreas implicadas en distintos aspectos de los movimientos oculares de seguimiento en cuanto a su control y planificación (Gottlieb y col., 1994; Tanaka y Lisberger, 2002; Krauzlis, 2004) que se localizan en la corteza frontal y algunas parecen estar compartidas con el subsistema sacádico.

- 1.1.1.6. **Movimientos de vergencia:** Los movimientos de vergencia son desplazamientos no conjugados de la mirada producidos para emplazar el objeto de interés en ambas retinas. Dependiendo de la distancia del objeto, ambos ojos se dirigirán hacia una posición nasal (convergencia) cuando el punto de interés esté cerca, o se separarán entre ellos (divergencia) si la diana se aleja. La sensación de profundidad es creada por el sistema visual cuando hay una disparidad retinal entre ambos ojos. Este mismo estímulo sirve al sistema de vergencia para controlar lo que se conoce como movimientos fusionados de vergencia. En la mayoría de las ocasiones, no todos los objetos percibidos visualmente están enfocados en la retina, debido a que se encuentran a una distancia diferente y, por lo tanto, percibimos su imagen borrosa. Para obtener una mejor definición de un objeto situado a una profundidad diferente, los animales necesitan ajustar el radio de curvatura del cristalino. Este mecanismo se conoce como acomodación del cristalino y es llevado a cabo por el músculo ciliar al contraerse. Los movimientos de vergencia son en general de poca amplitud (menos de cinco grados) y lentos, tardándose más de un segundo en finalizarlos. Su latencia es de 150-200 ms, pero pueden ser mucho más rápidos cuando se realizan en conjunción con movimientos sacádicos (van Leeuwen y col., 1998).

En este tipo de movimiento, están implicados únicamente los músculos extraoculares. La convergencia se lleva a cabo mediante la contracción y la relajación simultánea de los músculos recto interno y recto externo, respectivamente. En cambio, la divergencia ocurre gracias a la contracción de los dos músculos recto externo. En el mono, se han descrito dos grupos de neuronas premotoras implicadas en el control de los movimientos de vergencia (Mays, 1984). El primero de ellos se localiza dorsal y lateral al NMOC, en la región reticular mesencefálica el área supraoculomotora, y el segundo grupo se halla en una porción rostral al colículo superior (Judge y Cumming, 1986; Mays y col., 1986). El disparo de ambos grupos de neuronas está relacionado con la vergencia, la acomodación o ambas. Algunas de estas células codifican el ángulo de vergencia (neuronas tónicas), otras la velocidad del movimiento (neuronas fásicas), aunque también se han descrito neuronas codificantes de ambas señales, las cuales presentan un disparo tónico-fásico (Mays y col., 1986; Zhang y col., 1992).

Las neuronas del NMOE y del NMOC emiten señales independientes para realizar movimientos conjugados y de vergencia (Mays y Porter, 1984). Hay evidencias de la participación en el control de los movimientos de vergencia de la corteza frontal y posterior (Gamlin y col., 1996), así como de varias estructuras cerebelares como la región flocular y núcleos profundos cerebelares (Zhang y Gamlin, 1998). Sin embargo, no está claro aún cómo llegan las señales de vergencia a las motoneuronas del NMOE. Se ha sugerido que las mismas neuronas premotoras que proporcionan las señales para los movimientos conjugados podrían proveer de las órdenes para realizar movimientos de vergencia (Chen-Huan y McCrea, 1998).

1.1.1.7. **Fijaciones oculares:** Para el mantenimiento de la agudeza visual, los ojos necesitan mantener su posición cuando se observa un objeto de interés (Figura 3, fijaciones). Esto se lleva a cabo mediante un sistema activo capaz de transformar las órdenes de la mayoría de las neuronas premotoras que codifican velocidad, en señales posición que llegan a las motoneuronas oculares. Esta transformación consiste en una integración en términos matemáticos, por lo que se conoce a las neuronas que realizan esta operación como “integradores neuronales”. Básicamente, todos los tipos de movimientos oculares comparten un integrador neuronal común, localizado en diferentes núcleos para los sistemas horizontales (Cannon y Robinson, 1987), torsionales y verticales (Crawford y col., 1991; Helmchen y col., 1998). Son varias las estructuras implicadas en la integración de las señales de velocidad a posición en el plano horizontal. Gracias a experimentos de

lesión, se ha demostrado que los núcleos prepositus hipoglossi, el vestibular medial (Cannon y Robinson, 1987), el flóculo del cerebelo (Fukushima y col., 1992) y algunas neuronas del tracto paramediano (Nakamagoe y col., 2000), son esenciales para mantener la mirada tras un sacádico. En los planos vertical y torsional, el integrador de velocidad a posición se encuentra en la formación reticular del troncoencéfalo, en un núcleo bien delimitado conocido como el núcleo intersticial de Cajal (Fukushima y col., 1992).

1.1.1.8. **Reflejo vestibulo-ocular:** El reflejo vestibulo-ocular es un conjunto de movimientos oculares compensatorios que estabilizan la imagen en la retina cuando la cabeza se mueve, produciendo movimientos de los ojos en la misma velocidad pero en la dirección opuesta. Mientras que la aceleración de la cabeza en el espacio se percibe por los canales semicirculares, la posición de la cabeza respecto a la gravedad se detecta por los otolitos del oído interno (el utrículo y el sáculo en los mamíferos). Estos órganos también responden a la aceleración lineal asociada a la traslación de la cabeza. La latencia de este reflejo es muy rápida, entre los 7 y los 15 ms (Johnson y Sharpe, 1994). Los componentes de la respuesta del VOR dependen de la frecuencia del estímulo: a altas frecuencias, el reflejo consiste únicamente en un componente compensatorio lento, moviendo los ojos a la misma velocidad que el estímulo, pero en la dirección opuesta. A frecuencias menores de estimulación, se activan dos tipos diferentes de respuestas oculares, un componente lento compensatorio y un componente rápido no compensatorio dirigido en la misma dirección que el estímulo (ver Figura 3, B). El propósito de estos movimientos rápidos es recentrar el ojo en la órbita. Son similares a los que se producen espontáneamente y comparten algunas de las rutas neuronales que los generan (Igusa y col., 1980; Ohki y col., 1988). Ambos componentes, rápidos y lentos, son conocidos como nistagmos oculares.

Las estructuras relacionadas con el control de este reflejo se localizan casi exclusivamente en el tronco del encéfalo, aunque el flóculo del cerebelo juega un importante papel modulador de la respuesta durante el aprendizaje del VOR (Lisberger y col., 1984) y el control de la fase de seguimiento relacionada con aspectos de la interacción visual-vestibular (Krauzlis y Lisberger, 1996). En los últimos años, se ha demostrado que el VOR puede ser cancelado activamente por grupos neuronales ubicados en la corteza, bien reduciendo la ganancia del reflejo, o bien produciendo movimientos oculares de seguimiento en la dirección opuesta (Gordon y col., 2008). Esta

inhibición del VOR podría facilitar el control de la mirada durante tareas que combinen la rotación de la cabeza y de los ojos.

El VOR rotacional se activa por señales procedentes de los canales semicirculares del oído interno. Hay tres pares de canales (horizontal, anterior y posterior) unidos entre ellos por su ángulo derecho. Estas estructuras perciben la aceleración angular causada por la rotación de la cabeza o del cuerpo. En concreto, el desplazamiento de la endolinfa durante el movimiento produce la activación de células ciliadas localizadas en la ampolla del canal. Las células ciliadas (neuronas vestibulares primarias) transforman el estímulo mecánico en despolarizaciones que se transmiten hasta las neuronas del núcleo vestibular (neuronas vestibulares secundarias) a través del nervio vestibular (VIII par craneal; Straka y Dieringer, 2004; Newlands y Perachio, 2003). A nivel central, las fibras vestibulares discurren paralelas y se interconectan por pares antagónicos, es decir, derecho horizontal con izquierdo horizontal, izquierdo anterior con derecho posterior, derecho anterior con izquierdo posterior. Cada neurona vestibular recibe una aferencia monosináptica exclusivamente de un canal.

1.1.2. Fisiología de las neuronas del NMOE

1.1.3.1. Características morfológicas e histoquímicas: Las motoneuronas del sistema oculomotor poseen en general una forma poligonal y multipolar. Su arborización dendrítica presenta diferencias geométricas, morfológicas y de tamaño respecto a la de motoneuronas espinales y de otras motoneuronas craneales (Bras y col., 1987; Grantyn y col., 1977; Grantyn y Grantyn, 1978; Carrascal y col., 2005, 2006). Estudios comparativos realizados en gatos muestran que las motoneuronas del NMOE tienen un diámetro medio de $37,2 \pm 6,2 \mu\text{m}$, presentando unas 8-9 dendritas primarias por célula (Grantyn y Grantyn, 1978; McClung y col., 2001). En cambio, las neuronas internucleares del NMOE del gato pueden tener forma esférica, fusiforme o multipolar, con un diámetro medio de $25,7 \pm 6,3 \mu\text{m}$ (de la Cruz y col., 1994). Para más detalles de su distribución en el núcleo y conectividad sináptica, revisar las secciones 1.1.1.2 y 1.1.1.3.

Tanto en primates como en gatos, las motoneuronas y las neuronas internucleares del NMOE son colinérgicas (Kus y col., 2003; Spencer y Wang 1996; Carpenter y col., 1992). Sin embargo, las neuronas internucleares parecen emplear el glutamato y el aspartato como neurotransmisores (Nguyen y Spencer, 1999). Ambos

tipos celulares expresan multitud de proteínas de membrana, como proteínas de unión a Ca^{2+} (de la Cruz y col., 1998), receptores de factores tróficos (Benítez-Temiño y col., 2004), cadherinas (Heyers y col., 2004) o receptores de iones (Bhattacharjee y col., 2002) que podrían estar influyendo sobre sus propiedades y, por lo tanto, ser en parte responsables del comportamiento específico de estas neuronas.

1.1.3.2. Excitabilidad y propiedades de disparo: Hay dos parámetros fundamentales en el control de la actividad de las neuronas del NMOE, el umbral de reclutamiento y la modulación de la tasa de disparo. Ambas características dependen a su vez de las aferencias sinápticas (ver sección 1.1.1.3) y del umbral intrínseco. Dicho umbral está determinado por las propiedades eléctricas propias de cada neurona, mientras que la modulación de la frecuencia de disparo se ve influida además por los contactos aferentes recibidos, de manera que diferentes grupos de motoneuronas que comparten sus aferencias podrían mostrar un disparo muy diferente (revisado por Heckman y col., 2009). A su vez, estos contactos sinápticos recibidos podrían influir de diferentes maneras dependiendo de los neurotransmisores operantes y de las características de la membrana postsináptica, mediando corrientes iónicas, cambios en el potencial de membrana y la suma de señales somato-dendríticas. Sin embargo, las motoneuronas y las neuronas internucleares del NMOE comparten aferencias (Delgado-García y col., 1986a, b), y su patrón de disparo es muy similar. Su excitabilidad se modifica por la influencia de los neurotransmisores liberados en sus aferencias, que pueden actuar mediante dos sistemas: i) un mecanismo ionotrópico que implica la apertura de un canal iónico en la membrana celular, y por lo tanto produce despolarizaciones o hiperpolarizaciones que generan potenciales postsinápticos excitadores o inhibidores, respectivamente (PPSE y PPSI); ii) un mecanismo metabotrópico activado por la unión del neurotransmisor a receptores que inician rutas de señalización intracelulares, modulando las propiedades de canales voltaje-dependientes que determinan las propiedades intrínsecas de la neurona e influyen en su respuesta ionotrópica (Heckman y col., 2009).

En las siguientes secciones se describen los mecanismos principales que determinan el comportamiento eléctrico de las neuronas del NMOE.

1.1.3.3. Corrientes iónicas: La modulación de los canales iónicos de la membrana regula la excitabilidad de estas neuronas. Por lo tanto, estas células tendrán un comportamiento umbral o de disparo en función de si su respuesta a corrientes iónicas concretas supera

o no el valor umbral del potencial de membrana (Kernell, 2006). Dadas las similitudes existentes entre el patrón de disparo de las dos poblaciones neuronales del NMOE, se podría asumir que las principales corrientes iónicas que intervienen en su comportamiento son (Figura 4):

- **Corrientes de Na⁺:** i) de inactivación rápida ($I_{Na\ i}$; 1-4 ms en motoneuronas espinales; Ogata y Ohishi, 2002), descritas en todos los tipos de motoneuronas y responsables de la fase de despolarización de potenciales de acción Na⁺-dependientes, estando implicadas posiblemente en el control de la frecuencia máxima de su disparo. ii) Las corrientes de Na⁺ persistentes ($I_{Na\ p}$) son exclusivas de motoneuronas de los núcleos facial, hipogloso y trigémino (Ogata y Ohishi, 2002; Zeng y col., 2005), no se inactivan y se relacionan con una aceleración de la despolarización sub-umbral.
- **Corrientes de K⁺:** los canales de K⁺ son los responsables del comportamiento subumbral de la membrana, de la forma del potencial de acción y de las propiedades de disparo, lo que los hace una diana neuromoduladora ideal para la regulación de la excitabilidad. Además de la corriente de salida de K⁺ que participa en el mantenimiento del potencial de membrana en reposo junto a la de entrada de Na⁺ y a la fuga de Cl⁻, hay que destacar i) la corriente rectificadora de entrada de K⁺ (I_{Kir}), mediada por canales Kir (Hille, 1992; Rudy, 1988; Nichols y col., 1997), disminuye con la despolarización al cerrarse dichos canales, y aumenta con la hiperpolarización al abrirse. Los neurotransmisores actúan sobre los canales Kir reduciendo su actividad e influyendo en la excitabilidad neuronal. ii) La corriente de K⁺ rectificadora de salida retrasada (I_{Kdr}), se activa por una despolarización que participa en la fase de repolarización del potencial de acción y en la post-hiperpolarización (Rudy, 1988). iii) La corriente de K⁺ de salida transitoria (I_A) es una conductancia inactivadora que comienza al producirse una despolarización y cesa ante una hiperpolarización (Viana y col., 1993a, b). Afecta al inicio y a la fase estacionaria del disparo, y al ser bloqueada, la repolarización se prolonga y la post-hiperpolarización se reduce temporalmente (Hsiao y Chandler, 1995; Safronov y Vogel, 1995; Takahashi, 1990a; Viana y col., 1993b). iv) Las corrientes de K⁺ activadas por Ca²⁺ pueden ser de 2 tipos, BK o SK ($I_{K\ Ca(Bk)}$ y $I_{K\ Ca(Sk)}$, respectivamente). Las primeras producen una alta conductancia de K⁺ por la apertura de canales selectivos voltaje-dependientes o activados por un incremento intracelular del Ca²⁺ que tiene lugar durante el potencial de acción (Rudy, 1988). Actúan reduciendo la fase de repolarización (Viana y col., 1993b). Las corrientes SK dan lugar a una conductancia de K⁺ menor y los canales que la producen no son voltaje-dependientes. Es la corriente de mayor importancia en la post-

hiperpolarización (Kobayashi y col, 1997; Viana y col., 1993b). v) Las corrientes de K^+ activadas por Na^+ ($I_{K Na}$) producen la hiperpolarización post-descarga que ocurre tras un tren de potenciales de acción gracias a la acumulación interna de Na^+ (Safronov y Vogel, 1996). Estas corrientes no han sido descritas en motoneuronas extraoculares, pero sí este tipo de hiperpolarización, por lo que su presencia sería plausible. vi) Por último, también se han descrito corrientes catiónicas mixtas (Na^+-K^+) activadas por hiperpolarización (I_h ; Mosfeldt Laursen y Rekling, 1989; Pape, 1996; Takahashi, 1990b; Viana y col., 1994). Son corrientes de entrada subsiguientes a hiperpolarizaciones que dan lugar al restablecimiento post-inhibitorio contribuyendo a la restauración del potencial de membrana (Bayliss y col., 1994; Larkman y Kelly, 1992).

- **Corrientes de Ca^{2+} :** Se han descrito tres tipos de canales de Ca^{2+} dependientes de alto voltaje (L, N y P; $I_{Ca HVA}$) y uno dependiente de bajo voltaje (T; $I_{Ca LVA}$) en motoneuronas del núcleo hipogloso (Umemiya y Berger, 1994). Las corrientes de calcio intervienen en la fase de repolarización del potencial de acción, la post-despolarización y la post-hiperpolarización (Harada y Takahashi, 1983; Umemiya y Berber, 1994; Viana y col., 1993a, b). Los canales de Ca^{2+} tipo L juegan un papel central en la generación de potenciales en meseta de algunas motoneuronas (Hounsgaard y Kiehn, 1989; Hsiao y col., 1998). i) Existen unas corrientes de Ca^{2+} activadas por Na^+ ($I_{Na Ca}$) que parecen ser responsables de la prolongación de la meseta en el disparo que se produce en respuesta a señales aferentes breves o inyecciones de corriente. ii) Corrientes de Ca^{2+} activadas por cationes no específicos (I_{CAN}), que se han descrito en motoneuronas espinales (Hounsgaard y Kiehn, 1993; Svirskis y Hounsgaard, 1998).

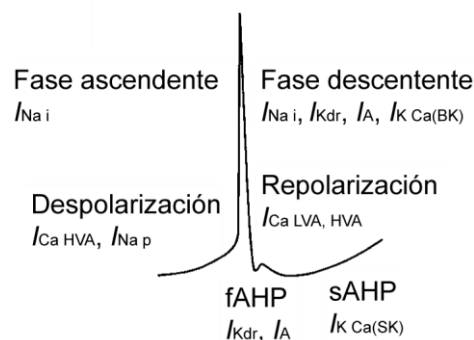


Figura 4. Conductancias iónicas asociadas al potencial de acción de motoneuronas oculomotoras. Corrientes iónicas responsables de cada etapa del potencial de acción. I_A , corriente de potasio de salida transitoria; $I_{Ca HVA}$, corriente de calcio dependiente de alto voltaje; $I_{Ca LVA}$, corriente de calcio dependiente de bajo voltaje; $I_{K Ca(BK)}$, corriente de potasio de alta conductancia activada por calcio; $I_{K Ca(SK)}$, corriente de potasio de baja conductancia activada por calcio; $I_{K dr}$, corriente de potasio rectificadora de salida retrasada; $I_{Na i}$, corriente de sodio de inactivación rápida; $I_{Na p}$, corriente de sodio persistente. Otras abreviaturas: fAHP, fase rápida de la post-hiperpolarización; sAHP, fase lenta de la post-hiperpolarización. Adaptado de Rekling y col., 2000.

1.1.3.4. **Propiedades intrínsecas de membrana:** Las membranas de las motoneuronas oculomotoras, y asumiblemente de las neuronas internucleares, poseen características propias pasivas y activas que influyen sobre la excitabilidad neuronal. Estas propiedades intrínsecas se ha determinado gracias a estudios con preparaciones *in vitro* e *in vivo* (Sasaki, 1963; Pretch y Baker, 1972; Llinás y Baker, 1972; Barmarck, 1974; Grantyn y Grantyn, 1978; Grantyn y col., 1977; Durand, 1989a, 1989b; Carrascal et al., 2006; Tsuzuki et al., 1995; Russier et al., 2003).

- **Propiedades pasivas de membrana:**

- **Potencial de membrana en reposo (V_m):** La separación de cargas a ambos lados de la membrana establece un potencial, que en condiciones de reposo puede variar entre los -58 y -65 mV en motoneuronas del NMOC (Carrascal y col., 2006; Durand, 1989b).
- **Potencial rectificador:** Tras un pulso despolarizante o hiperpolarizante, en la membrana se produce un potencial rectificador que trata de restaurar el potencial de reposo. La amplitud de la rectificación depende del voltaje del pulso y está mediado por corrientes de Na^+ .
- **Resistencia de entrada (R_N):** Es el cambio en el voltaje de membrana asociado a la inyección de una corriente dividido por la intensidad de esa corriente de entrada. Empíricamente, se obtiene a partir de la pendiente de la regresión entre pulsos crecientes de corriente inyectados frente a la amplitud máxima del potencial de membrana evocado por cada pulso. Este parámetro depende el lugar donde sea registrado (soma o dendritas proximales) y de la velocidad de conducción de la neurona. En estudios *in vivo* realizados en el gato y la rata, su valor promedio oscila entre 0,8 y 8 M Ω (Barmack, 1974; Sasaki, 1963; Baker y Precht, 1972; Grantyn y Grantyn 1978; Durand, 1989b). En cambio, los valores calculados *in vitro* son mayores en general, 6-75 M Ω (Guéritaud, 1988; Carrascal y col., 2005; Tsuzuki y col., 1995).
- **Velocidad de conducción:** Se calcula a partir de la latencia de potenciales de acción antidrómicos y es proporcional a al diámetro del axón y a la R_N . La velocidad de conducción medida en motoneuronas del NMOE es de 25-84 m/s, mientras que para las neuronas internucleares es de 14 – 54 m/s (Delgado-García y col., 1986a,b).
- **Constante de tiempo de la membrana:** Correspondería al tiempo que se tarda en que el potencial de membrana alcance el 63% de su valor final. Puede

calcularse en base al curso temporal de los cambios del potencial de membrana que ocurren en respuesta a pasos de corriente hiperpolarizante. Dicho curso temporal, puede ajustarse empleando una serie de ecuaciones exponenciales, siendo el más lento el equivalente a τ . En registros efectuados en rodaja, se ha medido un valor promedio de 5 ms para motoneuronas del NMOC (Carrascal y col., 2005).

- **Propiedades activas de membrana:** Se miden aplicando pulsos de corriente despolarizante de distinta duración en el soma y registrando diferentes parámetros de la respuesta eléctrica neuronal.

- **Corriente reobase:** Se define como la corriente mínima para inducir un potencial de acción individual en la mitad de los eventos. Por lo tanto, cuanto mayor sea este parámetro, menor será la excitabilidad. La corriente reobase de las motoneuronas del NMOE medida en preparaciones *in vivo* de gato, es de 4,7 nA (Grantyn y Grantyn, 1978).
- **Umbral de despolarización:** Es la diferencia entre el potencial de membrana al que se produce un potencial de acción y el potencial de reposo. Para las motoneuronas oculomotoras, parece ser que el valor promedio de este parámetro es de 10 mV (Carrascal y col., 2005).
- **Características del potencial de acción:** Las motoneuronas de diferentes poblaciones producen potenciales de acción con distintas características, como son la amplitud, la anchura media, la despolarización máxima, la hiperpolarización máxima y el tiempo hasta la post-hiperpolarización. Estas propiedades intrínsecas están determinadas por conductancias iónicas como las descritas anteriormente, algunas de las cuales son comunes en diferentes poblaciones neuronales, o bien son específicas para determinar una frecuencia de disparo y una excitabilidad concretas (revisado por Bean, 2007).

1.1.3.5. **Patrón de disparo:** Evarts fue pionero en el registro extracelular unitario de motoneuronas extraoculomotoras en animales despiertos (Evarts, 1966), pero el primero en realizar cuantificaciones y en desarrollar una correlación matemática entre los movimientos oculares y el disparo de las motoneuronas fue Robinson. Tanto las neuronas oculomotoras poseen un patrón de actividad tónico-fásico que se correlaciona con la posición y la velocidad ocular en el animal en estado de alerta (González-Forero y col., 2003; Robinson, 1981; Delgado-García y col., 1986a; Fuchs y col., 1988). Este tipo de disparo se requiere para superar las fuerzas viscoelásticas del mecanismo oculomotor

(Robinson, 1964). Durante las fijaciones oculares, una vez alcanzado el umbral de reclutamiento, las neuronas oculomotoras muestran un disparo estable que se ve incrementado linealmente durante movimientos dirigidos en la dirección de activación. Para las motoneuronas del NMOE, que inervan el músculo recto externo, serían movimientos realizados en el plano horizontal hacia el lado homolateral al núcleo, es decir, movimientos de abducción (Fuchs y Luschei, 1970). Al mismo tiempo, las neuronas internucleares de este núcleo envían señales activadoras a motoneuronas del recto interno del NMOC contralateral, induciendo en el ojo contralateral al NMOE un desplazamiento en dirección nasal, es decir, un movimiento de aducción. La actividad tónica contrarresta los elementos elásticos de los tejidos orbitales y mantiene el globo ocular estático en la órbita. Durante las fijaciones, cada neurona extraocular puede ser caracterizada por dos parámetros, su sensibilidad a la posición ocular (k) y su umbral de reclutamiento (Um) o la posición ocular a la dicha célula es reclutada. El disparo de la célula cuando la mirada se mantiene recta hacia el frente (0 grados) se denomina F_0 . Para conocer la formulación matemática que permite el cálculo de estos parámetros, ver la sección 3.4. Tanto en el mono como en el gato, los valores de k para las motoneuronas del NMOE oscilan entre 1 y 18 pa/s/grado. Sin embargo, hay discrepancias en cuanto a su valor promedio en las motoneuronas de estas especies, entre 4 y 8 pa/s/grado (Keller y Robinson, 1971; Fuchs y col., 1988; Delgado-García y col., 1986a; González-Forero y col., 2003). Estas diferencias se deban posiblemente a procedimientos metodológicos o a movimientos oculares restringidos que tienen lugar en el gato (Delgado-García y col., 1986a). Posiblemente, estos mismos factores sean también los responsables de la variación de los valores de k medidos en las neuronas internucleares del NMOE, que oscila entre los 1 y 21 pa/s/grado, siendo el rango del valor promedio 7 – 12 pa/s/grado (Benítez-Temiño y col., 2002; de la Cruz y col., 2000; Delgado-García y col., 1986b). El Um varía entre neuronas de la misma población, pero en general, las motoneuronas del NMOE presentan valores que van desde los 60 grados en la dirección contralateral, a los 20 grados en la homolateral, mientras que las neuronas internucleares muestran umbrales de 20 grados contralaterales a 3 homolaterales (Benítez-Temiño y col., 2002; Delgado-García y col., 1986b). Varios autores han descrito una covariación de los parámetros Um y k . Así, neuronas con una menor sensibilidad a la posición ocular serían reclutadas en posiciones más excéntricas del hemicampo visual contralateral, mientras que aquellas células que poseen una k mayor, son reclutadas más tarde conforme los ojos se mueven hacia el lado homolateral

de activación (Fuchs y col., 1988; Ling y col., 2007; Hazel y col., 2002; Pastor y González-Forero, 2003). Durante años, se ha sugerido que el U_m y la k de las neuronas extraoculomotoras podrían ser consecuencia de las propiedades intrínsecas de membrana y/o de las aferencias sinápticas (Dean, 1997). Sin embargo, estudios *in vitro* han demostrado una relación inversa entre el umbral de despolarización de motoneuronas extraoculares y la ganancia del potencial de acción, pudiendo descartarse por lo tanto la hipótesis de que las propiedades intrínsecas de membrana son el mecanismo responsable del U_m (Nieto-González y col., 2007). Es más, otros estudios realizados por el mismo grupo han demostrado la importancia de aferencias muscarínicas en la determinación del U_m y de la k en motoneuronas del NMOE (Nieto-González y col., 2009). En otros experimentos *in vivo* en los que se desconectó a las neuronas del NMOE de su diana natural forzando la retirada de sus aferencias sinápticas, también han demostrado la importancia que juegan las conexiones aferentes en dichas neuronas (de la Cruz y col., 1994, 2000; Delgado-García y col., 1986a, b; Pastor y col., 2000), apoyando la hipótesis de que las entradas sinápticas son las principales responsables de estos parámetros.

La actividad de las neuronas del sistema oculomotor también está relacionada con la velocidad ocular durante los movimientos sacádicos, de seguimiento, de vergencia y el VOR. Estas neuronas disparan brotes de potenciales de acción justo antes del inicio de sacádicos en la dirección de activación (9 ms para las motoneuronas, 10 ms para las neuronas internucleares del NMOE; Delgado-García y col., 1986; Sylvestre y Cullen, 1999). La tasa máxima de disparo alcanzada durante un sacádico no se mantiene y decrece siguiendo aproximadamente una dinámica exponencial hacia la frecuencia tónica correspondiente a la nueva posición (Delgado-García y col., 1986; Sylvestre y Cullen, 1999). Esta caída exponencial es diferente en cada neurona y se conoce en general como “caída post-sacádica”. En cambio, durante movimientos sacádicos en la dirección contralateral, la actividad de estas neuronas decrece llegando incluso a pausarse antes del inicio del sacádico (15 ms en motoneuronas y 21 ms en neuronas internucleares). Así pues, el disparo fásico de estas neuronas está relacionado con la duración y la amplitud del movimiento sacádico. El parámetro que define la frecuencia de disparo durante los sacádicos es la sensibilidad neuronal a la velocidad ocular (r ; la ecuación para su cálculo se detalla en la sección 3.4). En las motoneuronas y en neuronas internucleares del NMOE del gato, el valor promedio de r es cercano a 1 y a 2 pa/s/grado/s, respectivamente (Delgado-García y col., 1986a, b; Pastor y González-

Forero, 2003). Hay que destacar que el área de la frecuencia máxima de disparo durante el brote y de la velocidad pico del movimiento ocular están relacionadas linealmente.

Axotomía del fascículo longitudinal medial

Como ya se ha comentado anteriormente (sección 1.1.1.2), el FLM es un tracto nervioso central por el cual discurren los axones de las neuronas internucleares del NMOE para contactar sinápticamente con las motoneuronas del NMOC contralateral, que controlan la actividad del músculo recto interno para la coordinación de los movimientos de ambos ojos en el plano horizontal. La sección de este haz nervioso se ha empleado en numerosos estudios previos del grupo con el fin de determinar los efectos electrofisiológicos, motores y morfológicos que tienen sobre las neuronas axotomizadas la privación de su diana natural (de la Cruz y col., 2000; Pastor y col., 2000), el aporte de un nuevo tejido diana potencial (Benítez-Temiño y col., 2002, 2003, 2005), y en el presente trabajo, la inyección de células progenitoras neurales en la zona de lesión de sus axones. A continuación se describirán los aspectos más relevantes de esta lesión en el gato adulto como modelo de estudio.

1.2.1. Alteraciones morfológicas debidas a la sección del fascículo longitudinal medial

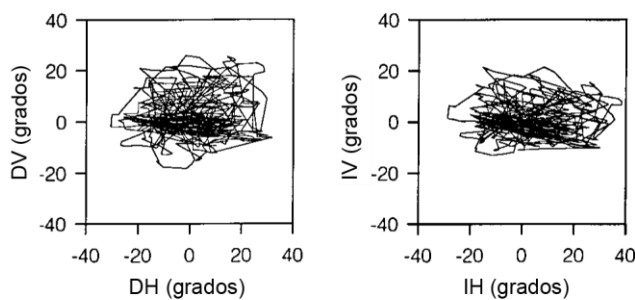
Cuando un axón es dañado por contusión o seccionado, tienen lugar una serie de cambios degenerativos en ambas direcciones de la lesión. El extremo distal del axón se inflama y forma unos corpúsculos esferoides engrosados. Las células de Schwann (en el sistema nervioso periférico) o los oligodendrocitos (en el sistema nervioso central) inician un proceso degenerativo que continúa con la fagocitosis de restos de mielina y elementos axónicos por parte de macrófagos que acuden a la zona. Este mecanismo se conoce como degeneración walleriana (revisado por Fu y Gordon, 1997). En el sistema nervioso periférico, los efectos derivados de este tipo de lesión son generalmente transitorios, debido a la permisividad de esta división del sistema nervioso al recrecimiento del axón, formando un nuevo cono de crecimiento (Webber y col., 2008). Por otro lado, en el extremo proximal del axón, cercano a la lesión, tienen lugar una serie de cambios similares que inician una secuencia de alteraciones en el soma (revisado por Johnson y col., 2005), haciendo que la neurona pase de un estado funcional en el que la prioridad es la integración de señales aferentes, la producción de neurotransmisores y la conducción de potenciales de acción, a un estado regenerativo donde la maquinaria celular se vuelca en la reparación de la membrana del axón, la remielinización y el guiado axonal del cono

de crecimiento. De esta manera, en el sistema nervioso periférico, el axón puede volver a alcanzar de nuevo una diana, y las neuronas lesionadas recuperan su estado normal (Brännström y col., 1992). Sin embargo, en el sistema nervioso central, las neuronas seccionadas no pueden restablecer los contactos sinápticos con su diana, alterando permanentemente sus propiedades celulares y en algunos casos, sufriendo su muerte celular. La axotomía central de las neuronas internucleares del NMOE no conlleva su muerte, habiéndose demostrado su supervivencia hasta tres meses después de la lesión (Pastor y col., 2000). Mediante el empleo de biocitina, un trazador neuronal anterógrado, se observó que, a pesar de que los axones lesionados desarrollan un crecimiento abortivo para tratar de contactar con nuevas dianas en dirección caudal, la cicatriz glial que se produce en el lugar de la lesión impide que crucen más allá de esta zona. Estos hallazgos se ratificaron a nivel ultraestructural, no habiéndose apreciado evidencias de una reinervación generalizada, puesto que en la mayoría de los casos no se encontraron axones marcados contactando con nuevas neuronas. El aspecto del citoesqueleto no pareció verse modificado por la lesión. Sin embargo, las células axotomizadas experimentaron una retirada de las aferencias sinápticas dispuestas sobre la superficie de su membrana, a favor de un incremento de contactos con procesos astrocíticos. Varios autores han sugerido que los astrocitos podrían ser los que estén participando activamente en esta retirada de las aferencias sinápticas impidiendo con sus procesos la reconexión (Derouiche y col., 2002). En cambio, hay otros trabajos que apuntan hacia un desarrollo de estos procesos gliales con posterioridad a la retracción de los terminales presinápticos (revisado por Svensson y col., 1993). De cualquier modo, la respuesta glial establece un microambiente óptimo para el reemplazo de las aferencias (Aldskogius y col., 1999), ya que la inflamación local y la consecuente activación de células gliales que suponen una fuente de factores tróficos, podrían ser esenciales para la reconexión de los terminales presinápticos (Emirandetti y col., 2006; Ribotta y Privat, 2001). Por otro lado, también se ha descrito una reducción del tamaño somático de las neuronas internucleares del NMOE tras su axotomía (de la Cruz y col., 2000).

1.2.2. Alteraciones motoras debidas a la sección del fascículo longitudinal medial

Tal y como ha sido mencionado, la cicatriz glial formada en la zona de la lesión impide cualquier posibilidad de reconexión de la diana original. Es por ello que, a partir del momento de transección del FLM, los movimientos oculares horizontales se vuelven descoordinados (de la Cruz y col., 2000). Para el estudio de la actividad eléctrica de las neuronas responsables de los movimientos de los ojos, es preciso que la lesión sea unilateral, permitiendo así la comparación de un circuito interrumpido con uno intacto. Así pues, de la Cruz y col. describieron que a consecuencia de la sección del FLM derecho, los animales lesionados experimentaron una reducción en la capacidad de su ojo derecho para realizar movimientos de aducción más allá de la línea media de su campo visual, mientras que el rango motor del ojo izquierdo permaneció intacto. Por tanto, el ojo derecho de estos animales vio reducida su capacidad de exploración del hemisferio izquierdo (Figura 5). El conjunto de estas deficiencias causadas por el daño del FLM se conoce como oftalmoplegia internuclear (Delgado-García y col., 1986b).

A. Control



B. Post-lesión

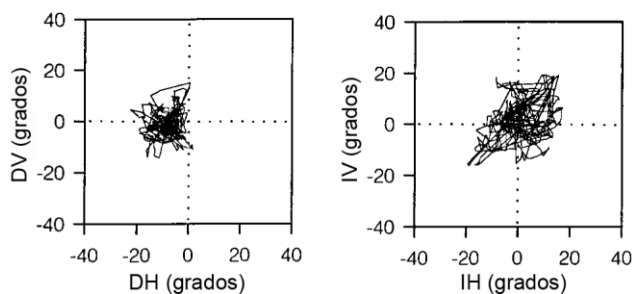


Figura 5. Alteraciones en los movimientos espontáneos del gato tras la axotomía del fascículo longitudinal medial derecho. **A**, Gráficos representando el campo motor recorrido por cada ojo a lo largo de 5 minutos de movimientos espontáneos antes (**A**) y después (**B**) de la transección del FLM derecho. Para cada ojo (D, derecho; I, izquierdo), se representa el componente vertical (V) frente al horizontal (H). Los movimientos dirigidos hacia la izquierda y hacia arriba se representan como positivos (en grados). En **B** se aprecia que tras la lesión, el ojo derecho sufrió una restricción del movimiento horizontal hacia el hemisferio izquierdo. Adaptado de de la Cruz y col., 2000.

1.2.3. Alteraciones electrofisiológicas debidas a la sección del fascículo longitudinal medial

La axotomía produce una gran variedad de alteraciones en los potenciales postsinápticos, probablemente debidos a la retirada o a la redistribución de los terminales aferentes. De hecho, se han descrito modificaciones en la amplitud y duración de potenciales

postsinápticos de motoneuronas oculomotoras tras la estimulación de fibras presinápticas (Delgado-García y col., 1988; Kuno y Llinás, 1970).

Las propiedades pasivas de la membrana también se ven alteradas por la axotomía. En general, el potencial de reposo y la amplitud del potencial de acción no se modificados (Baker y col., 1981; Kuno y Llinás, 1970b), aunque sí afecta a la resistencia de entrada (incrementándose) y la corriente reobase (disminuyendo) en algunos tipos de motoneuronas (Gustaffson y Pinter, 1984; Kuno y Llinás, 1970). Los cambios en el perfil del potencial evocado junto al aumento de la resistencia de entrada y a la disminución de la corriente reobase sugieren un aumento de la excitabilidad en el compartimento somatodendrítico y su disminución en el segmento inicial del axón. Es más, en el segmento inicial de motoneuronas del NMOE tras su axotomía se ha descrito el fallo antidrómico de potenciales evocados, lo que apoya la hipótesis de una reducción de la excitabilidad en este compartimento (Baker y col., 1981).

Otra característica que parece verse modificada es la duración de la post-hiperpolarización. En motoneuronas axotomizadas inervantes de músculos lentos se ha detectado una reducción de esta fase del potencial de acción, cambio que puede asociarse a la adquisición del fenotipo típico de una motoneurona inmadura, ya que se ha observado una duración similar de la post-hiperpolarización en motoneuronas fásicas embrionarias. Además, la axotomía altera la velocidad de conducción axonal debido a una reducción del diámetro y a un acortamiento de la distancia intermodal (Baker y col., 1981).

Todos estos cambios mencionados se ven reflejados en alteraciones del patrón de disparo de las neuronas lesionadas. Al axotomizar una motoneurona o una neurona internuclear del NMOE, experimentan una reducción de las sensibilidades a la posición y a la velocidad ocular. Sin embargo, existen diferencias notables entre ambos casos. El ambiente permisivo en el sistema nervioso periférico hace posible que las motoneuronas axotomizadas reinerven su diana 2-3 meses después de la sección del VI par craneal, lo que induce la recuperación de sus propiedades estructurales y funcionales. En cambio, los efectos de la axotomía de las neuronas internucleares del NMOE son irreversibles, debido probablemente a los impedimentos que sufren las neuronas centrales para reinervar otras dianas tras su axotomía (de la Cruz y col., 2000; Delgado-García y col., 1988; Pastor y col., 2000).

1.3. Factores neurotróficos

Entre las neuronas y las células a las que inervan existe una relación trófica a largo plazo. Las células diana son capaces de producir, en cantidades limitantes, unas sustancias esenciales para la supervivencia y maduración neuronal: los factores neurotróficos (teoría trófica de las conexiones neuronales; Purves y col., 1990). Estos factores neurotróficos son captados por los terminales nerviosos de las neuronas aferentes y ejercen en éstas sus funciones a través de distintos mecanismos de acción. Dichos factores juegan un importante papel durante el desarrollo embrionario, regulando los procesos progresivos y regresivos que tienen lugar para estabilizar y seleccionar los contactos sinápticos adecuadamente establecidos, causando la degeneración de las neuronas que no interactúan correctamente con su diana, estableciendo así una competición entre las neuronas por estos factores derivados de dichas células post-sinápticas. En cambio, en el sistema nervioso adulto la relación se vuelve menos importante en cuanto a la supervivencia del terminal pre-sináptico, pero adquiere en cambio un papel fundamental en el mantenimiento de sus propiedades estructurales y fisiológicas. Cuando una neurona se ve aislada de su diana, experimenta multitud de cambios tanto estructurales como sinápticos, repercutiendo en última instancia en sus propiedades de disparo, su degeneración e incluso, en último término, en su muerte celular (Titmus y Faber, 1990; de la Cruz y col., 2000; Martin y col., 2003). Estos cambios fisiológicos se deben en gran medida a que el aporte trófico por parte de las células diana se vuelve deficitario, independientemente de si el aislamiento se ha producido por un método físico (axotomía) o químico (interrupción de la conducción del impulso nervioso o bloqueo del mecanismo sináptico). Es por ello que se han realizado numerosos experimentos consistentes en el aporte exógeno de estos factores neurotróficos para revertir la muerte celular o su atrofia (Koeberle y Bähr, 2008), restaurar sinapsis (Novikov y col., 2000; Davis-López de Carrizosa y col., 2008) o reinducir el crecimiento axonal (Jones y col., 2003). Este papel neuroprotector de los factores tróficos tras una lesión (Chao, 2003) es uno de los pilares fundamentales de este trabajo.

Los diferentes factores tróficos pueden ser clasificados en familias, las neurotrofinas, las neuroquinas, la superfamilia del TGF- β y la superfamilia de factores tróficos no neuronales. A continuación, se resumen las principales características de los factores tróficos más relevantes para el presente trabajo, puesto que son sintetizados por las células progenitoras neurales derivadas de la zona subventricular, que como se describe más adelante, serán implantadas en el modelo de lesión del sistema oculomotor que se emplea en este estudio.

1.3.1. Superfamilia del TGF- β

Los miembros de esta superfamilia de factores de crecimiento son la familia del factor de crecimiento transformante β (TGF- β), la familia del factor de crecimiento derivado de células gliales (GDNF), la familia de las proteínas morfogénicas del hueso (BMP) y la familia de las activinas. Ejercen funciones críticas durante el desarrollo y en el mantenimiento de numerosos tipos neuronales del sistema nervioso.

1.3.2. Superfamilia de factores de crecimiento no neuronales

En esta superfamilia se incluye al factor ácido de crecimiento de fibroblastos (aFGF), al factor de crecimiento epidérmico (EGF) y al factor de crecimiento insulínico (IGF) entre otros. Sus efectos son de diversas naturalezas, actuando a través de receptores específicos y no sólo en el sistema nervioso.

1.3.3. Neurotrofinas

Es la familia de factores tróficos de mayor importancia. Está constituida por el factor de crecimiento nervioso (NGF), el factor de crecimiento derivado del cerebro (BDNF), la neurotrofina 3 (NT-3) y la neurotrofina 4/5 (NT-4/5). Existe un miembro adicional que no ha sido descrito en mamíferos, la neurotrofina 6. Son sintetizadas inicialmente como pro-neurotrofinas, cuya maduración enzimática produce la proteína madura. Estos precursores son biológicamente activos, pudiendo ejercer funciones distintas de la neurotrofina madura (Lee y col., 2001). Su acción está mediada por su unión con alta afinidad a receptores transmembrana tirosina quinasa, denominados Trk (con tres isoformas distintas en mamíferos, TrkA, TrkB y TrkC), y a un receptor de baja afinidad incluido en la superfamilia del receptor de necrosis tumoral conocido como p75 (p75^{NTR}; Yano y Chao, 2000; Hempstead y Salzer, 2002). Existe cierta especificidad en la relación ligando-receptor (Figura 6), ya que NGF se une preferentemente a TrkA, BDNF y NT-4/5 a TrkB y NT-3 a TrkC (bajo ciertas condiciones, también puede activar a los otros dos receptores Trk; Huang y Reichardt, 2001), mientras que todas las neurotrofinas pueden unirse a p75^{NTR} (Arévalo y Wu, 2006). Una de las formas de regulación del efecto de las neurotrofinas ocurre a través de la maduración de los receptores Trk, cuyo dominio citosólico con actividad tirosina quinasa puede no estar presente. Es el caso también de sus dominios extracelulares C1 (cisteína), C2, LRR1-3 (leucina), Ig1 (inmunoglobulina) e Ig2, que constituyen el lugar de unión de la neurotrofina y determina la especificidad gracias a un inserto adicional que puede estar ausente (Lewin y Carter, 2014). A su vez, la existencia de p75^{NTR} en la membrana puede reducir la afinidad de NT-3 por TrkA y TrkB, así como la de NT-4/5 por TrkB, al mismo tiempo que la unión conjunta de NGF a p75^{NTR} y TrkA modifica los efectos de esta neurotrofina. Por último, los receptores activos de neurotrofinas pueden transactivar a otras proteínas de membrana como

canales iónicos u otros receptores, ampliando aún más las posibilidades de modulación de los efectos de estos factores tróficos (Arévalo y Wu, 2006). Este sistema con dos receptores activables por neurotrofina amplía mucho el abanico de respuestas posibles, ya que cada receptor puede activar una ruta de señalización intracelular diferente. Es por ello que la expresión de los distintos tipos de receptores constituye una forma de regulación del efecto de las neurotrofinas en diferentes situaciones, como ante una lesión, estrés oxidativo o unos niveles elevados de neurotransmisores (Lewin y Carter, 2014).

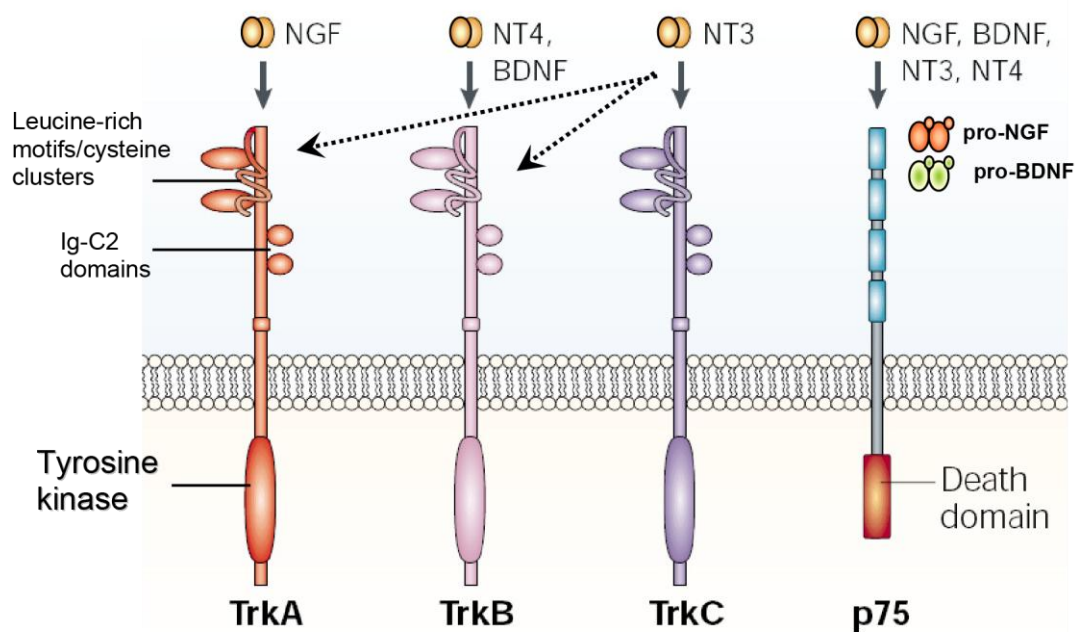


Figura 6. Receptores tirosina quinasa y p75 que median la acción de las neurotrofinas. La unión de una neurotrofina resulta en la dimerización de su receptor. Cada neurotrofina se une selectivamente a un receptor tirosina quinasa (Trk) específico, o de forma inespecífica al receptor p75. Los receptores Trk constan de dominios inmunoglobulina G (IgG) extracelulares para la unión del ligando, y un dominio catalítico tirosina quinasa intracelular. Cada receptor activa varias vías de señalización. La región extracelular de p75 contiene cuatro repeticiones ricas en cisteína, mientras que la intracelular carece de actividad tirosina quinasa y puede activar la muerte celular. Las neurotrofinas unidas a p75 median la supervivencia y la migración celular, así como la mielinización a través de diferentes rutas. Adaptado de Chao, 2003.

1.3.3.1. NGF: El NGF fue el primer factor neurotrófico descrito. Rita Levi-Montalcini y Stanley Cohen hallaron una molécula soluble en un sarcoma de ratón que inducía el crecimiento de nervios simpáticos en embriones de pollo (Levi-Montalcini, 1982). Además de los efectos en la supervivencia de neuronas simpáticas y sensoriales *in vitro*, este factor promueve la arborización dendrítica y la diferenciación en neuronas de la corteza cerebral, en neuronas colinérgicas del estriado y en neuronas de los ganglios basales (Kolb y col., 1997). Existen varios trabajos que ponen de manifiesto su importancia, como es el caso de un estudio con ratones deficientes en la expresión de NGF y de TrkA, con una inervación colinérgica hipocampal disminuida en consecuencia (Terenghi, 1999). Barbacid también describió importantes deficiencias sensoriales termorreceptivas y la ausencia total de nocicepción en un modelo animal similar (Barbacid, 1995).

1.3.3.2. BDNF: Esta neurotrofina tiene varios efectos en distintas etapas madurativas. Se ha demostrado que promueve la supervivencia celular en neuronas sensoriales y motoneuronas espinales de embriones de pollo, así como la migración de neuronas corticales y cerebelosas durante el desarrollo (Davies y col., 1986; Oppenheim y col., 1992). En individuos adultos, el BDNF participa en procesos que inducen la neurogénesis y la supervivencia de neuroblastos de la zona subventricular (Bath y Lee, 2010). También se han encontrado evidencias de que induce el desarrollo de fibras nerviosas noradrenérgicas en neuronas espinales (Hayashida y col., 2008), y de que mejora la efectividad sináptica en neuronas del hipocampo en relación al aprendizaje y la memoria (Falkenberg y col., 1992). La carencia de BDNF conlleva graves efectos neuronales, como los descritos para las neuronas vestibulares de ratones deficitarios en esta neurotrofina, las cuales se atrofian y mueren en gran número, desarrollando alteraciones en la coordinación de movimientos y en el sentido del equilibrio (Barbacid, 1995).

1.3.3.3. NT-3: La neurotrofina 3 dirige la migración de neuronas corticales y cerebelares durante el desarrollo (Maisonpierre y col., 1991), regula la supervivencia de diferentes poblaciones neuronales como neuronas simpáticas, vestibulares, espinales y motoneuronas (Rosenthal y col., 1990; Dechant y col., 1993) y promueve el crecimiento de neuronas sensoriales y motoneuronas de la médula espinal (Ernfors y col., 1994), entre otros efectos. Se ha descrito que las neuronas de los ganglios espinales cervicales y lumbares, así como las del núcleo trigémino, poseen un importante contenido en NT-3, y que la deficiencia de esta neurotrofina ocasiona la pérdida de la arborización dendrítica en el núcleo trigémino (Barbacid, 1995). Así mismo, también se ha demostrado la

potencialidad terapéutica de la administración continuada de NT-3 al haberse logrado con ello la restauración de la velocidad de conducción sensorial y motora tras la sección de un nervio periférico (Terenghi, 1999).

1.3.4. Neuroquinas

Estas moléculas ejercen su acción uniéndose al complejo constituido por el receptor pg130 y el receptor β del factor inhibidor de leucemia (LIFR β ; Metcalf, 1986). Los miembros más relevantes de esta familia son el factor neurotrófico fibrilar (CNFT), el factor inhibidor de leucemia (LIF), la interleuquina 6 (IL-6) y el factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF).

1.3.4.1. VEGF: Esta neuroquina es el factor angiogénico más importante en el desarrollo embrionario, en procesos patológicos y en la permeabilidad vascular (revisado por Ferrara y col., 2012). Se le han atribuido otras funciones importantes en el sistema nervioso de carácter neuroprotector, neurotrófico y neurogénico (Jin y col., 2002; Sköld y Kanje, 2008; Nowacka y Obuchowicz, 2012). Existen seis factores homólogos constituyentes de la familia del VEGF (Figura 7): VEGF-A (el primero en ser descrito; Ferrara y col., 2003), VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D, VEGF-E y PlGF (factor de crecimiento placentario), habiéndose encontrado influencia de los tres primeros sobre células neurales (Sathasivam, 2008). Además, se han descrito varias isoformas de VEGF-A producto de un *splicing* alternativo. Los receptores de mayor importancia son tipo tirosina quinasa y se denominan VEGFR-1 (Flt-1), VEGFR-2 (Flk-1) y VEGFR-3 (Flt-4). El dominio extracelular de estos receptores posee siete inmunoglobulinas, unidas a un dominio transmembrana conectado a su vez a un dominio intracelular con una secuencia consenso tirosina quinasa (Ferrara y col., 2003). El VEGFR-2 es fundamental para una correcta diferenciación y la organización de las células endoteliales en los lechos vasculares, influyendo en la mitogénesis, angiogénesis y el aumento de la permeabilidad inducidos por el VEGF. VEGFR-1 parece tener un papel regulador, puesto que al activarse, impide la unión de VEGF a VEGFR-2 disminuyendo la angiogénesis (Ferrara y col., 2003). Por último, se ha relacionado al VEGFR-3 con la linfangiogénesis y la neurogénesis en la zona subventricular (Calvo y col., 2011). También se han descrito unos receptores no pertenecientes a la familia tirosina quinasa a los que el VEGF puede unirse adicionalmente, neuropilina 1 (NP-1) y neuropilina 2 (NP-2), cuya actividad está relacionada con el guiado axonal (Ferrara y col., 2003).

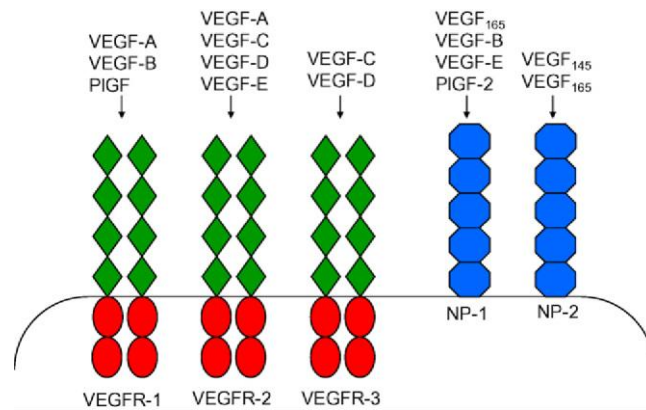


Figura 7. Ligandos y receptores de la familia del factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF). Los miembros de la familia del VEGF tienen diferentes patrones de unión a sus receptores tirosina quinasa (VEGFR-1, VEGFR-2, VEGFR-3) y a sus receptores neuropilina (que actúan como co-receptores de VEGFR-1 o de VEGFR-2) que no son del tipo tirosina quinasa (NP-1, NP-2): VEGF-A, VEGF-B y el factor de crecimiento placentario (PIGF) se unen a VEGFR-1; VEGF-A, VEGF-C, VEGF-D y VEGF-E se unen a VEGFR-2; VEGF-C y VEGF-D se unen a VEGFR-3; la isoforma VEGF₁₆₅ (del VEGF-A), VEGF-B, VEGF-E y PIGF-2 se unen a NP-1; las isoformas VEGF₁₄₅ y VEGF₁₆₅ (ambas del VEGF-A) se unen a NP-2. Tomado de Sathasivam, 2008.

1.4. Factores tróficos en el sistema oculomotor

Las neurotrofinas posiblemente sean fundamentales para la actividad normal del sistema oculomotor, puesto que se ha demostrado la expresión de TrkA, TrkB y TrkC en todas las poblaciones neuronales de los núcleos de este circuito en el gato (Benítez-Temiño y col., 2004). Tanto es así que al desconectar a las motoneuronas del NMOE de su diana mediante la sección del VI par craneal, interrumpiendo así el flujo retrógrado de factores tróficos, se produjeron alteraciones en la expresión del ARNm de los receptores de neurotrofinas, de manera que el ARNm de TrkB se vio incrementado y el de TrkC reducido, pudiendo concluirse que las neurotrofinas que se unen específicamente a estos receptores podrían influir distintamente en las respuestas de regeneración y supervivencia neuronal que se activan como consecuencia de la axotomía (Morcuende y col., 2011).

Profundizando más en la influencia de los factores tróficos en las propiedades fisiológicas de las neuronas oculomotoras, el grupo realizó previamente unos estudios consistentes en la administración exógena de diferentes neurotrofinas al extremo seccionado del axón de motoneuronas del NMOE (Davis-López de Carrizosa y col., 2008). La reducción de la tasa de disparo asociada a las fijaciones oculares se vio recuperada tras la aplicación de BDNF al extremo distal seccionado, mientras que el tratamiento con NT-3 restauró el disparo fásico que produce los movimientos sacádicos de los ojos. Es más, el suministro combinado de las dos neurotrofinas produjo una recuperación total del disparo de las motoneuronas axotomizadas

(Davis-López de Carrizosa y col., 2009). Posiblemente, estos efectos de BDNF y NT-3 sobre el patrón de disparo están asociados a la restauración de la cobertura sináptica tanto en los somas como en el neuropilo también descrita en dicho trabajo. Cuando la neurotrofina administrada en ese mismo modelo fue el NGF, el efecto observado fue muy similar al del tratamiento combinado de BDNF y NT-3, con una recuperación total de las aferencias excitatorias e inhibitorias a nivel del soma y del neuropilo de las motoneuronas axotomizadas, acompañada de un restablecimiento del disparo tónico y fásico (Davis-López de Carrizosa y col., 2010).

De estos estudios se puede concluir que en el sistema oculomotor existe una gran dependencia del mantenimiento trófico de la diana, y que las neurotrofinas que proceden de ella influyen en el mantenimiento tanto de sus aferencias, como de sus propiedades de disparo.

Otro factor trófico con una gran importancia potencial en este circuito es el VEGF. Un reciente estudio realizado también por el grupo ha demostrado la expresión de VEGF y de su receptor Flk-1 (VEGFR-2) en todas las motoneuronas del sistema oculomotor (Morcuende y col., 2014). Esta neuroquina se ha empleado en diferentes modelos de lesión del sistema nervioso por su influencia sobre la neurogénesis y la angiogénesis. Concretamente, la administración de VEGF retrasa la pérdida de motoneuronas y mejora la ejecución motora en diferentes modelos animales de esclerosis lateral amiotrófica (ELA; Lambrechts y col., 2003; Azzouz y col., 2004; Stormkebaum y col., 2005; Sathasivam, 2008), la sobreexpresión neuronal de este factor trófico retarda la neurodegeneración y eleva la tasa de supervivencia de ratones en los que se ha generado ELA (Widenfalk y col., 2003), y también se ha relacionado con la transmisión sináptica al demostrarse que el VEGF puede causar una depresión de la transmisión sináptica excitadora en neuronas piramidales y granulares del hipocampo, así como en motoneuronas del núcleo hipogloso (McCloskey y col., 2005; 2008).

1.5. Reacción glial a la lesión del sistema nervioso central

El 90% de las células del cerebro humano son células gliales. A pesar de no ser capaces de producir potenciales de acción, intervienen activamente en la comunicación entre neuronas, al mismo tiempo que cumplen una función homeostática de soporte y reparación en el tejido nervioso. Se han identificado varios tipos de células gliales, tan diferentes que algunos poseen un origen embrionario diferente. En el sistema nervioso central, aquellos tipos que derivan del ectodermo, se denominan macroglía, y son los astrocitos, la glía positiva NG2 y los oligodendrocitos, mientras que las células gliales que proceden del mesodermo, se conocen como microglía. En cambio, en el sistema nervioso periférico, las células gliales principales son

las células de Schwann, constituyentes de la vaina de mielina que rodea a los nervios periféricos (Verkhatsky y Butt, 2007). A continuación, se describen las características más relevantes de cada población glial.

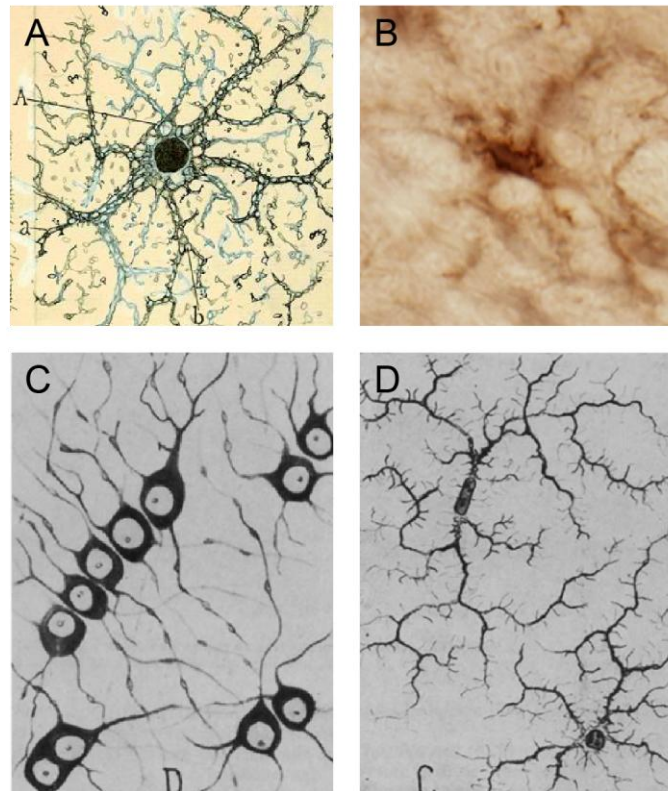


Figura 8. Células gliales del sistema nervioso central. *A, C y D*, Ilustraciones realizadas por Pío del Río Hortega de un astrocito protoplásmico de la sustancia gris (*A*), oligodendrocitos de la sustancia blanca (*C*) y células microgliales (*D*). En *B* se muestra una imagen de microscopía óptica de una célula glial positiva a NG2 del sistema nervioso central de rata tras una tinción inmunohistoquímica contra NG2. Los dibujos (*A, C y D*) se han tomado de Iglesias-Rozas, 2012.

1.5.1. Astrocitos

Son el tipo celular más abundante. Su morfología es estrellada con prolongaciones de su membrana alargadas y estrechas (Figura 8, A), con una gran abundancia de filamentos constituidos mayoritariamente por la proteína glial fibrilar ácida (GFAP). Desde su descripción en 1893 por Michael von Lenhossek, se ha descubierto la participación de astrocitos en varios procesos de gran relevancia, como la formación de nuevas sinapsis, la constitución y la regulación de la barrera hematoencefálica, así como en el control de la microcirculación cerebral. También colaboran en la generación y el desarrollo de nuevas células del sistema

nervioso (Mori y col., 2005), forman parte de la constitución de algunas sinapsis cerebrales con tres componentes o *tripartitas* (presináptico, astrocítico y post-sináptico; Perea y Araque, 2010), y parecen ser muy importantes en procesos de aprendizaje y memoria (Han y col., 2013).

1.5.2. Glía positiva a NG2

Estas células gliales, descritas inicialmente por William Stallcup en 1980, están presentes tanto en el SNC, como en el SNP. Expresan un proteoglicano condroitín sulfato (NG2) de forma específica y la mayoría de los marcadores de progenitores de oligodendrocitos, puesto que actúan como tal. Sin embargo, no expresan moléculas específicas de oligodendrocitos maduros, ni GFAP (marcador de astrocitos). En cuanto a su morfología, constan de un soma de pequeño tamaño del que parten numerosas prolongaciones (Figura 8, B). Su ciclo celular es lento (varias semanas), aunque pueden incrementar considerablemente su tasa de división ante un daño en el tejido nervioso (Dimou y Götz, 2014). La glía positiva a NG2 está implicada en la formación de la vaina de mielina, dado que dan lugar a oligodendrocitos maduros que mielinizan axones, proceso activado por la detección de señales mediante sus prolongaciones extendidas hasta los nodos de Ranvier en la sustancia blanca (Butt y col., 1999). De hecho, se ha descrito que establecen contactos con astrocitos, oligodendrocitos y macrófagos en el proceso de formación de la cicatriz glial en el lugar de una lesión (Butt y col., 2005). Además, bajo ciertas condiciones, también pueden diferenciarse en neuronas y astrocitos (Belachew y col., 2003; Zhou y col., 2008; Rivers y col., 2013). Por último, la glía positiva a NG2 también es conocida como sinantocitos (Butt y col., 2005), debido a que son las únicas células gliales capaces de recibir contactos sinápticos funcionales procedentes de neuronas del hipocampo, el cerebelo, la corteza, el cuerpo calloso y el nervio óptico (Bergles y col., 2000; Lin y Bergles, 2004).

1.5.3. Oligodendrocitos

Pío del Río Hortega fue el primer investigador en describirlos en 1928 (Figura 8, C). Los oligodendrocitos son las células gliales encargadas de la síntesis de la mielina que envuelve a los axones centrales, participando también en el desarrollo de los nodos de Ranvier (Kaplan y col., 2001). En la sustancia gris, hay un tipo de oligodendrocitos denominados “satélite” cuya función aún se desconoce (Verkhatsky y Butt, 2007).

1.5.4. Microglía

Esta población glial mesodérmica descrita también por Pío del Río Hortega, representa un 10% de toda la glía del SNC y está presente en todo el cerebro, aunque pueden ser encontradas en mayor densidad en el hipocampo, el telencéfalo olfativo, los ganglios basales y en la sustancia negra (Verkhatsky y Butt, 2007). Esta distribución tan amplia se debe a que durante el desarrollo embrionario, las células mesodérmicas precursoras de microglía migran

hacia el interior del tubo neural, donde completan su maduración (Saijo y Glass, 2011). La microglía forma parte del sistema inmune del cerebro, desarrollando por tanto funciones neuroprotectoras y reparadoras. Poseen diferentes estados de activación: i) ante unas condiciones fisiológicas, las células microgliales están en reposo, con un soma de pequeño tamaño y varias prolongaciones delgadas dispuestas radialmente en continuo movimiento (Figura 8, D), muestreando su zona de influencia exclusiva (Saijo y Glass, 2011). ii) En caso de producirse un daño en el tejido derivado de una infección aguda o de la presencia de un microorganismo patógeno, los procesos microgliales detectan señales concretas y la célula microglial adquiere un estado de activación M1 (Goldmann y Prinz, 2013), en el que se retiran las prolongaciones y se incrementa el tamaño somático adoptando una morfología ameboide con capacidad fagocítica, liberando factores asociados a la respuesta inmune como citoquinas pro-inflamatorias, interleuquina 1 (IL-1), IL-6 o el factor de necrosis tumoral α (TNF- α). iii) En otras circunstancias, aún no del todo claras, la microglía puede activarse de forma alternativa o M2, exhibiendo una morfología similar al estado M1, pero con liberación en este caso de citoquinas antiinflamatorias como IL-4, IL-10 o TGF- β (factor transformante del cerebro β), que intervienen en la remodelación del tejido, su reparación y su recuperación (Mathieu y col., 2010; Goldmann y Prinz, 2013). Este proceso de activación es gradual y difiere en distintas áreas del cerebro según el origen del daño (Kettenmann y Verkhratsky, 2011).

1.5.5. Respuesta glial a la axotomía

La sección de un nervio central es una lesión de naturaleza mecánica que conlleva una respuesta por parte de las células gliales (Figura 9). En primer lugar, los astrocitos del entorno acuden al lugar dañado donde se vuelven reactivos. Con este fenotipo, liberan mucopolisacáridos, factores tróficos (NGF, BDNF y NT-3), citoquinas e interleuquinas siguiendo una estrategia neuroprotectora que trata de disminuir la muerte neuronal de las células dañadas. El objetivo de la acumulación de astrocitos y mucopolisacáridos es la constitución de una barrera delimitante que impide la extensión de la muerte celular secundaria más allá de la zona lesionada, lo que se conoce como cicatriz glial. Desafortunadamente, esta estructura impide la regeneración de los axones seccionados. Siempre que esta lesión suponga una rotura de la barrera hematoencefálica, acuden también macrófagos del entorno. La microglía de la zona se activa, adquiere un estado fagocítico y libera tanto sustancias citotóxicas (radicales libres de oxígeno), como citoquinas pro-inflamatorias (IL-1, IL-6, TNF- α ; Verkhratsky y Butt, 2007). Por otro lado, la glía positiva a NG2 incrementa su tamaño celular y la velocidad de su proliferación. Aunque la mayoría de estas células se mantiene como glía positiva a NG2, algunas de ellas se

diferencian en oligodendrocitos maduros y células GFAP-positivas, pasando a formar parte de la cicatriz glial (Dimou y Götz, 2014).

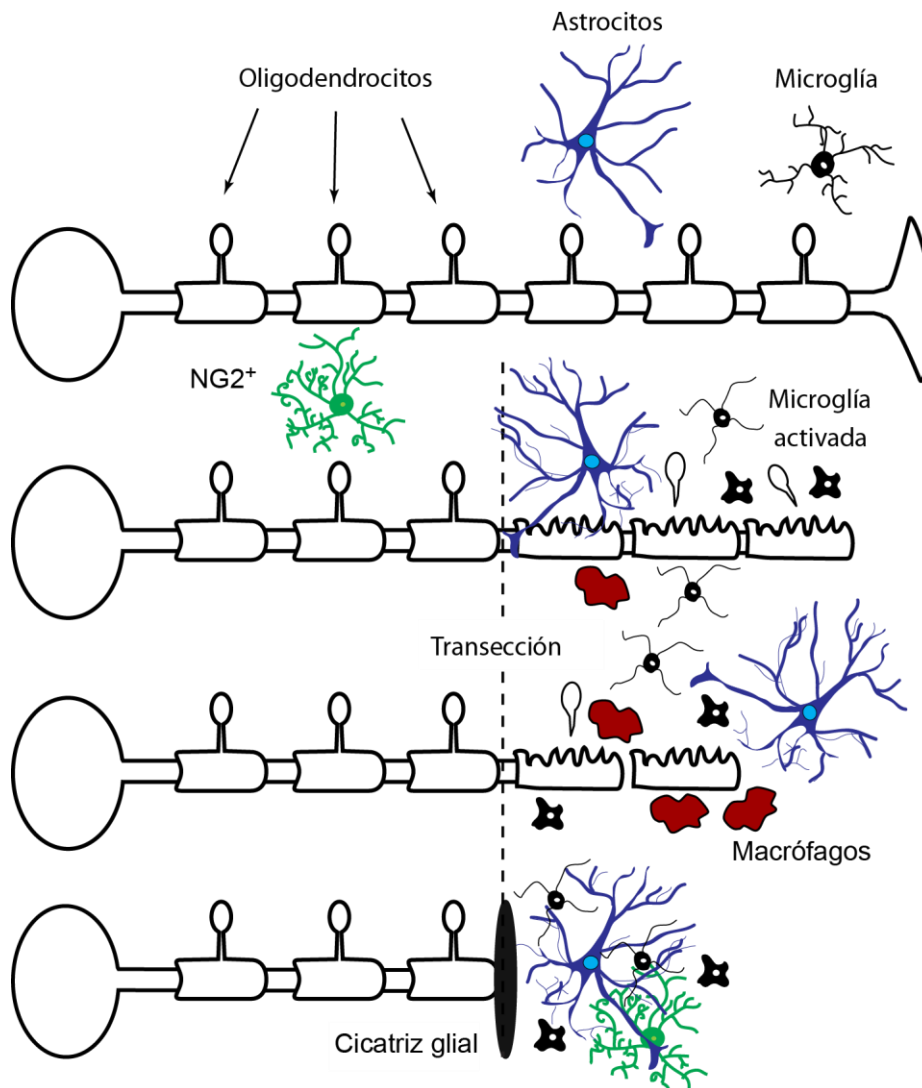


Figura 9. Respuesta glial a la axotomía en el sistema nervioso central. Ilustración en la que se representa una neurona intacta (en el diagrama superior) con células gliales en torno a su axón: astrocitos, en azul; oligodendrocitos, en blanco; glía positiva a NG2, precursoras de oligodendrocitos, en verde, NG2⁺; y microglía, en negro. Al realizar la transección de su axón (trazos inferiores), se produce la activación de los astrocitos, la glía NG2⁺ y la microglía (que pasa en su mayor parte al tipo ameboide, como se ilustra en la figura, en negro), a la vez que acuden macrófagos (en rojo) a la zona de la lesión. Finalmente, los restos del axón dañado (cabo distal) son fagocitados y se constituye la cicatriz glial. Adaptado de Verkhratsky y Butt, 2007.

1.6. Una nueva diana: células progenitoras neurales

1.6.1. Neurogénesis postnatal

Los estudios realizados por Joseph Altman en la década de los 60 abrieron una nueva etapa en la neurociencia al demostrar la existencia en el cerebro adulto de células proliferativas que originan nuevas neuronas en el giro dentado del hipocampo (Altman y Das, 1965). De esta manera, quedó patente que el proceso de formación de nuevas neuronas o *neurogénesis* no sólo tiene lugar durante el desarrollo embrionario y neonatal, sino que es un mecanismo continuo a lo largo de toda la vida de un individuo, relacionada hasta el momento con procesos de plasticidad, aprendizaje y comportamientos afectivos (Nottebohm, 1985; Alvarez-Buylla y col., 1990; Ming y Song, 2011). Hoy se sabe que la neurogénesis ocurre en áreas concretas del cerebro que reúnen una serie de características clave para ello (Figura 10), como son la capa subgranular del giro dentado del hipocampo (Eriksson y col., 1998), la zona subventricular (ZSV) de la pared de los ventrículos laterales (Reynolds y col., 1992; Luskin, 1993; Doetsch y Alvarez-Buylla, 1996), la corteza piriforme, la sustancia negra y la zona subcallosa (Zhao y col., 2003; Seri y col., 2006; Yuan y col., 2015), aunque estas últimas tres zonas siguen siendo objeto de debate.

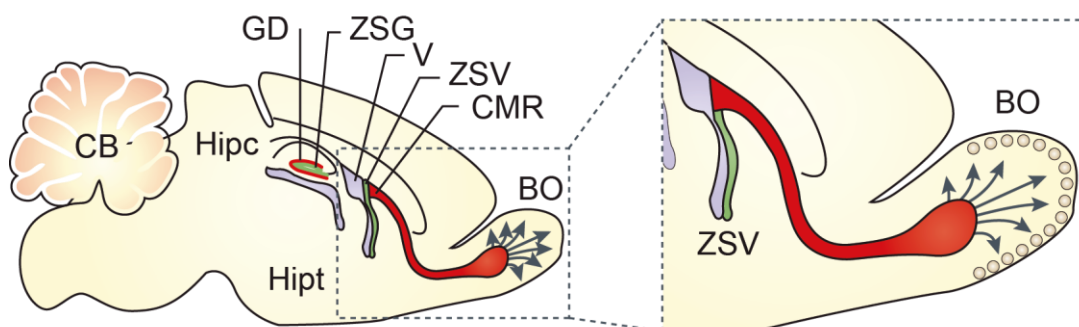


Figura 10. Principales nichos neurogénicos en el cerebro adulto de mamíferos: la zona subgranular y la zona subventricular. Diagrama que representa una sección sagital de un cerebro de ratón adulto donde se representa la localización de los dos nichos neurogénicos principales: la zona subgranular (ZSG, en verde) del giro dentado (GD, en rojo) del hipocampo (Hipc), y la zona subventricular (ZSV, en verde) adyacente a los ventrículos laterales (V) de la que parte la corriente migratoria rostral (CMR, en rojo) hacia el bulbo olfatorio (BO), mostrados a mayor detalle en la imagen enmarcada a la derecha. Las flechas representan la migración radial que realizan los neuroblastos al finalizar su trayecto por la CMR para diferenciarse en interneuronas inhibitorias de las capas granular y periglomerular del bulbo olfatorio. A modo de referencia, se señala la localización del cerebelo (CB) y del hipotálamo (Hipt). Adaptado de Ghashghaei y col., 2007.

En la etapa embrionaria, la glía radial procedente de las células neuroepiteliales puede dar lugar a todas las células de la estirpe neural, astrocitos, neuronas y oligodendrocitos, por lo que puede ser definida como células progenitoras neurales (CPNs). En el cerebro adulto, tanto en el giro dentado como en la ZSV, existe una población que comparte características con la glía radial embrionaria, es decir, con capacidad de autorrenovación y, mediante divisiones asimétricas, producir astrocitos, oligodendrocitos y precursores neuronales que pueden generar a su vez nuevas neuronas. Fruto también de estas propiedades, las CPNs producen y liberan factores tróficos, lo que las convierte en una herramienta con gran potencialidad terapéutica en diferentes procesos neurodegenerativos y lesiones de distintas naturalezas. En el presente estudio, la población de progenitores neurales seleccionada fue la de la ZSV.

1.6.2. Las células progenitoras neurales de la zona subventricular

Aunque no se ha demostrado la equivalencia entre los progenitores neurales de la ZSV del embrión y del animal adulto, si se sabe que esta capa germinal se forma durante el desarrollo en una localización adyacente a la zona ventricular que rodea a los ventrículos laterales, y en base a la disposición y a las características de la proliferación celular de sus CPNs, posiblemente proceda de la eminencia germinal lateral (García-Verdugo y col., 1998).

Las CPNs de la zona subventricular de mamíferos adultos poseen numerosas similitudes con la glía radial, ya que generan células transitorias con alta capacidad proliferativa que dan lugar a neuroblastos o precursores neurales. Estos neuroblastos se desplazan en dirección frontal siguiendo la denominada corriente migratoria rostral, cursando tangencialmente al bulbo olfatorio a través de unas estructuras tubulares constituidas por astrocitos especializados. Ya en el bulbo olfatorio, los neuroblastos migran radialmente diferenciándose en interneuronas inhibitorias que pasaran a formar parte de las capas granular y periglomerular (Figura 10; Gashghaei y col., 2007).

En la ZSV del cerebro adulto se pueden diferenciar varias poblaciones celulares (Figura 11):

- Las células **tipo A** son neuroblastos con capacidad migratoria. Además poseen capacidad proliferativa (Lois y col., 1996), presentando una serie de moléculas específicas que pueden usarse como marcadores, como la forma polisializada de la molécula de adhesión celular neural (PSA-NCAM), β -III tubulina, doblecortina y el factor de transcripción Dlx2 (Doetsch y col., 1999).
- Las células **tipo B** son astrocitos con características de glía radial embrionaria (Merkle y col., 2004) que pueden actuar como células madre neurales durante procesos regenerativos y de la homeostasis fisiológica (Doetsch y Alvarez-Buylla, 1996). Se pueden

distinguir dos subtipos de células tipo B: i) las B1 se ubican entre los neuroblastos y una capa de células endimarias (tipo E; ver más adelante), y ii) las B2 se localizan entre los neuroblastos y el estriado. Al ser astrocitos, las células tipo B son positivas a GFAP y presentan unos procesos que contactan con la luz del ventrículo, con vasos sanguíneos y con otros tipos celulares de la ZSV. Además, envuelven a las células tipo A en la corriente migratoria rostral, constituyendo una barrera que separa a los neuroblastos del tejido circundante y liberando factores al interior del gliotubo que, junto a otros procedentes de la vasculatura que discurre paralela al camino rostral, ayudan a los neuroblasos en su migración hacia el bulbo olfatorio (Bozoyan y col., 2012; Snapyan y col., 2009; Whitman y Greer, 2009).

- Las células **tipo C** son precursores neurales transitorios de división rápida con la capacidad proliferativa más alta de la ZSV. Estas células son las que dan lugar a los neuroblastos migradores. Expresan nestina, el receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR) y el factor de transcripción *Dlx2* (Doetsch y col., 1997).
- Las células **tipo E** son células endimarias que revisten los ventrículos laterales (García-Verdugo y col., 1998). Se ha demostrado que intervienen en la neurogénesis adulta, puesto que expresan la proteína *Noggin*, fundamental para la formación de nuevas neuronas (Lim y col., 2000). En cuanto a su morfología, presentan un gran número de cilios que emplean para mantener la direccionalidad de la circulación del líquido cefalorraquídeo, hecho de gran relevancia en la orientación de las células tipo A durante su desplazamiento por la corriente migratoria rostral (Mirzadeh y col., 2009; 2010).

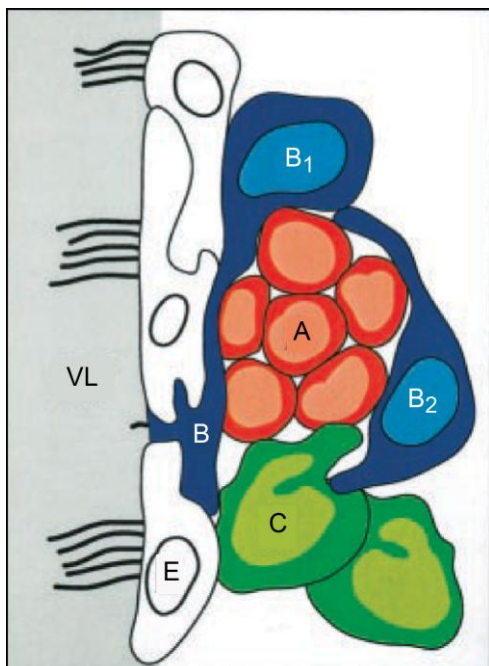


Figura 11. Tipos celulares de la zona subventricular. Esquema de los tipos celulares de la zona subventricular: las células endimarias (E, en color blanco) se localizan en contacto directo con los ventrículos laterales (VL); los astrocitos o células tipo B (B, en azul) rodean a los neuroblastos o células tipo A (en rojo) y contactan también con el resto de tipos celulares (las células B₁ se encuentran entre las tipo A y las tipo E, mientras que las B₂ se sitúan entre las tipo A y el estriado, a la derecha del esquema); los precursores neurales o células tipo C, se representan en verde. Adaptado de Alvarez-Buylla y García-Verdugo, 2002.

Entre los distintos tipos celulares con capacidad proliferativa de la ZSV existe una secuencia mediante la cual unos pueden dar lugar a otros. La división de las células tipo B da lugar a las tipo C. Estas se multiplican para aumentar la población y posteriormente, se diferencian en células tipo A. Al finalizar su migración hasta el bulbo olfatorio, las células tipo A se diferencian en neuronas (Doetsch y col., 1999; Alvarez-Buylla y Garcia-Verdugo, 2002).

Además de estas poblaciones celulares, en la ZSV hay células microgliales, endoteliales y pericitos de la unión neurovascular, que junto a las células anteriores establecen una serie de características exclusivas gracias a ciertas moléculas que producen para construir el nicho neurogénico de la ZSV, con un microambiente especializado en el mantenimiento y la funcionalidad de sus CPNs (Crouch y col., 2015; Ming y Song, 2011). Las neurotrofinas y el VEGF son algunas de estos factores constituyentes de las características del nicho neurogénico de la ZSV. Los astrocitos (tipo A) expresan NGF y BDNF, así como sus receptores de alta afinidad TrkA (también descrito en neuronas inmaduras) y TrkB, respectivamente. Las células endoteliales sintetizan NT-3 y su receptor de alta afinidad TrkC (Tonchev y col., 2007). Parece ser que el BDNF es la neurotrofina con mayor diversidad de funciones en la ZSV. Se ha descrito que promueve la supervivencia de CPNs en cultivo (Kirschenbaum y Goldman, 1995), aumenta la neurogénesis en el bulbo olfatorio al ser administrado en los ventrículos laterales (Zigova y col., 1998), y se ha demostrado que influye en la supervivencia y la migración de neuroblastos en la corriente migratoria rostral (Bath y Lee, 2010). El VEGF también parece ser muy importante en la ZSV, ya que se ha descrito su expresión en astrocitos, progenitores neurales y células endoteliales (que también poseen el receptor VEGFR-1; Tonchev y col., 2007). Al parecer, este factor trófico influye en la neurogénesis de esta área germinal, ya que al inducir la sobreexpresión del receptor VEGFR-3 en la ZSV se estimula la producción de nuevas neuronas sin afectar a la angiogénesis, y tanto la supresión de VEGFR-3 como su bloqueo reduce la neurogénesis (Calvo y col., 2011). Más recientemente, se ha encontrado una relación del VEGF procedente de los astrocitos constituyentes del gliotubo con la migración de los neuroblastos, interviniendo en la formación y crecimiento de la vasculatura paralela a la corriente migratoria rostral (Bozoyan y col., 2012).

1.6.3. Empleo de las células progenitoras neurales de la zona subventricular como una herramienta reparativa

En base a la multipotencialidad, la capacidad migratoria y la diversidad de factores tróficos que expresan *in vivo*, las CPNs de la zona subventricular poseen una gran potencialidad terapéutica. Además, se ha logrado su aislamiento y amplificación en cultivo bajo ciertas condiciones, donde pueden crecer en agregados flotantes conocidos como neuroesferas. Estas

agrupaciones están constituidas por células con una alta capacidad de proliferación y son capaces de diferenciarse a astrocitos, neuronas y oligodendrocitos al adherirse al sustrato (Doetsch y col., 2002). La conservación de estas características *in vitro* ha llevado a su empleo en forma de implantes en diferentes modelos de lesiones y de procesos neurodegenerativos del sistema nervioso, como la enfermedad de Huntington, la esclerosis múltiple, lesiones de la médula espinal o el accidente cerebrovascular (Cummings y col., 2005; Pluchino y col., 2005; Taupin, 2006). No obstante, la potencialidad terapéutica de estas células no se limita exclusivamente a la posibilidad de reemplazar a las neuronas dañadas y de restablecer circuitos neuronales, dado que también pueden interaccionar con células del sistema inmune del tejido hospedador y producir diferentes factores tróficos (Cusimano y col., 2012; Martino y Pluchino, 2006; Pluchino y Martino, 2005; Sabelström y col., 2013).

Teniendo en cuenta la fuerte dependencia de las neuronas internucleares del NMOE de los factores tróficos derivados de su diana, junto a las cualidades de las CPNs derivadas de la ZSV, el implante de estos progenitores neurales podría ser una estrategia reparativa útil para restaurar las propiedades fisiológicas que se alteran con la axotomía.

OBJETIVOS

2. OBJETIVOS

La hipótesis del presente trabajo es que resultaría posible el cultivo y la expansión de células progenitoras neurales de la zona subventricular de gatos neonatales y que al ser implantadas en el lugar de la sección del fascículo longitudinal medial de gatos adultos, podrían restaurar las propiedades fisiológicas de las neuronas afectadas por la lesión, debido a su potencialidad para convertirse en una nueva diana post-sináptica, como fuente de un soporte neurotrófico o por una respuesta de las células del tejido hospedador ante la presencia del implante.

Para validar esta hipótesis, se plantearon los siguientes objetivos específicos:

1. Caracterizar la integración de implantes de suspensiones celulares obtenidas de cultivos de células progenitoras neurales de la zona subventricular en una región altamente mielínica (fascículo longitudinal medial) que previamente habrá sido lesionada mediante lesión mecánica.
2. Analizar las características de supervivencia, proliferación, migración y diferenciación de las células implantadas.
3. Monitorizar en el animal alerta los patrones y características funcionales del disparo de potenciales de acción de neuronas previamente lesionadas antes y después del implante de progenitores neurales.
4. Describir la sinaptología aferente a estas neuronas lesionadas tras el implante de progenitores neurales mediante microscopía electrónica e inmunocitoquímica llevada a nivel de microscopía confocal.
5. Profundizar en las posibles causas de los efectos fisiológicos del implante observados en las células lesionadas.

MATERIALES Y MÉTODOS

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Animales

Los experimentos se llevaron a cabo en gatos (*Felis catus*) hembra adultos de raza europea con un peso de 2,0-2,5 kg, obtenidos de un centro autorizado (Universidad de Córdoba, Córdoba, España). Todos los procedimientos aplicados cumplieron la normativa de la Unión Europea (2010/63/EU) y la legislación española (R. D. 53/2013/BOE 34/11370-421), además de contar con la autorización del Comité Ético de Experimentación de la Universidad de Sevilla. El número de animales destinados a los diferentes procedimientos experimentales se describe a continuación:

- **Animales para registros electrofisiológicos:** Se prepararon cinco animales para registros electrofisiológicos, a los que se les seccionó el FLM ($n = 1$), o bien, adicionalmente a la lesión, se les practicó un implante de células progenitoras neurales ($n = 4$) que se realizó inmediatamente tras la lesión. También se usaron registros procedentes de seis animales control (datos no publicados; adquiridos por Pastor y González-Forero, 2003) y de dos animales lesionados (adquiridos por de la Cruz y col., 2000).
- **Animales para procedimientos inmunohistoquímicos de microscopía de fluorescencia:** Se desarrollaron dos estudios diferentes mediante la realización de tinciones inmunohistoquímicas para su análisis mediante microscopía confocal: a) el estudio de la integración de los progenitores neurales implantados en la zona lesionada del FLM, para lo cual se aprovechó el tejido procedente de los animales intervenidos en las diferentes condiciones experimentales (ver en el apartado 4.10), y b) el estudio de la cobertura sináptica de las neuronas internucleares del NMOE, para el cual se dedicaron animales adicionales ($n = 4$), algunos recibieron sólo la sección del FLM ($n = 2$) y otros la axotomía y el implante ($n = 2$). De cada animal, se obtuvo también tejido no tratado a modo de control, puesto que se lesionaron e implantaron de forma unilateral, disponiendo de este modo de un lado control y de otro tratado.
- **Animales para procedimientos de microscopía electrónica de transmisión:** Se axotomizaron e implantaron un total de dos animales ($n = 2$) para el análisis ultraestructural de la zona lesionada e implantada con los progenitores neurales.

- **Animales para la obtención de cultivos primarios de progenitores neurales:** Las células progenitoras neurales implantadas en los gatos adultos citados, se obtuvieron de la zona subventricular de animales de 3 - 5 días postnatal, siendo necesario el sacrificio de 8 animales ($n = 8$).

3.2. Preparación quirúrgica para el registro crónico de la actividad extracelular en el NMOE

La preparación de los animales para el registro crónico precisa su anestesia profunda. Previo a la anestesia, los animales se inyectaron con sulfato de atropina (0,5 mg/kg, i.m.) para reducir los reflejos vagales. A continuación, se les administró como anestésico clorhidrato de ketamina (20 mg/kg) mezclado con xilacina (0,5 mg/kg) por vía intramuscular.

Una vez inducida la sedación profunda, los gatos se colocaron en un aparato estereotáxico donde se mantuvo estable su temperatura corporal a 38°C mediante una manta térmica. Se practicó una incisión longitudinal en la piel sobre la línea media desde el borde anterior frontal hasta la sutura lamboidal y se eliminaron las inserciones musculares subyacentes. Utilizando un torno de dentista, se practicó una ventana cuadrada de unos 5 mm de lado en el hueso occipital, para permitir el acceso al NMOE a través del cerebelo durante las sesiones de registro. En el borde anterior de la ventana se fijó con cemento dental (Duralay, Worth, Illinois, EEUU) una aguja de acero inoxidable que sirvió como referencia estereotáxica para la localización del NMOE, según las coordenadas del atlas de Berman (1968). Se implantaron electrodos bipolares de estimulación intracraneal a la salida del VI par (bilateralmente) y en el FLM derecho para la activación antidrómica de las motoneuronas y de las neuronas internucleares del NMOE, respectivamente (Figura 12, A; Figura 13, A y B). Estos electrodos se fabricaron con alambre de plata barnizado de 200 μm de diámetro, retirando el aislante en los 0,5 mm finales. Las coordenadas de localización del nervio fueron de 1 mm posterior y 3,5 mm lateral al cero estereotáxico, a unos 26-27 mm de profundidad desde la superficie (según el atlas de Berman, 1968). La localización precisa del electrodo implantado fue la que requirió menor umbral de estimulación eléctrica para provocar el movimiento ocular de abducción en el ojo homolateral (pulsos de 50 μs de duración e intensidad $\leq 0,1$ mA). En el caso del electrodo situado en el FLM, las coordenadas de implantación fueron 2 mm anterior y 1 mm lateral al cero, a unos 20 mm de profundidad desde la superficie. El movimiento provocado en este caso fue la aducción del ojo homolateral. Tras la colocación de los electrodos, se insertaron en el cráneo 6 tornillos autorroscantes de acero inoxidable con punta roma, que se utilizaron

para construir y fijar una torreta de cemento dental (sobre el cráneo del animal) que, a su vez, contenía un conector y el sistema de inmovilización de la cabeza durante las sesiones de registro (3 tornillos de 35 mm de longitud y 4 mm de diámetro inmersos en la torreta para permitir la fijación de la cabeza a la mesa de registro; Figura 13, B).

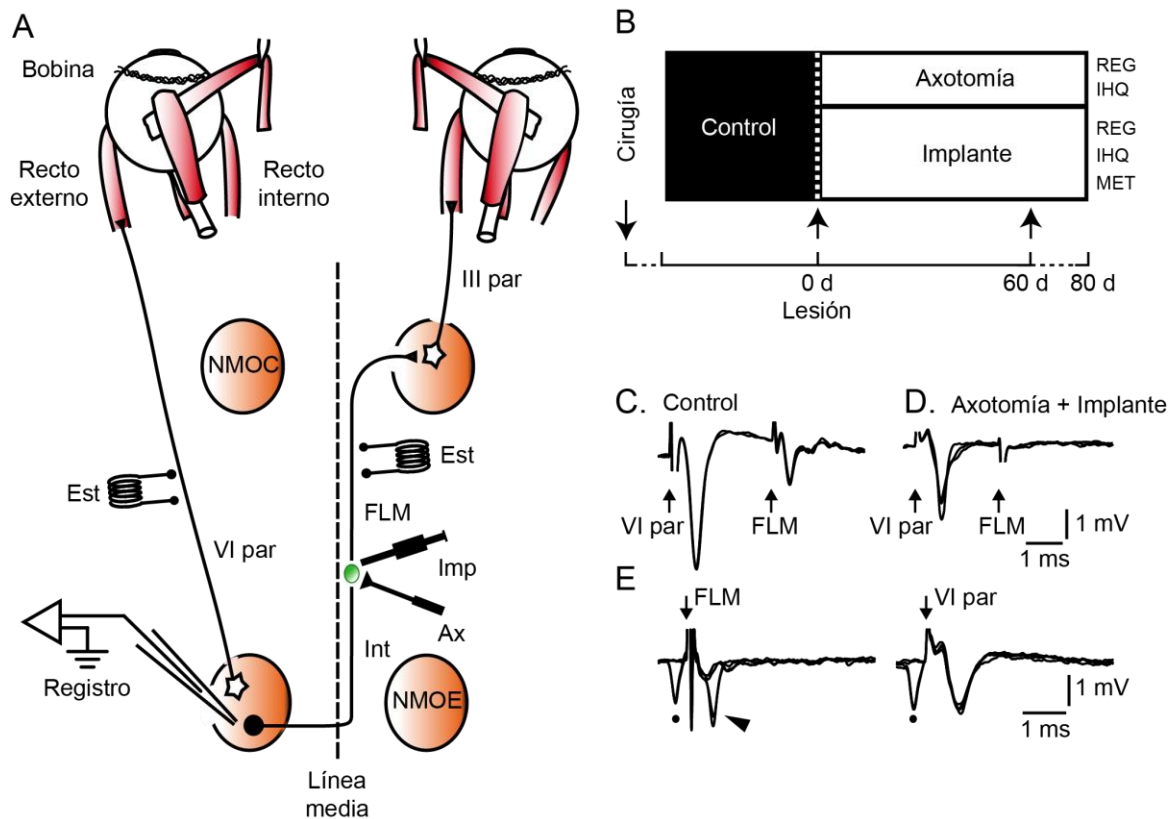


Figura 12. Diseño experimental para el registro de neuronas internucleares del núcleo motor ocular externo. **A**, Diagrama simplificado del sistema oculomotor, con la localización de los somas y las conexiones de sus neuronas. El núcleo motor ocular externo (NMOE) contiene motoneuronas que conectan con el músculo recto externo a través del VI par craneal (VI par), y neuronas internucleares (Int) que proyectan contralateralmente por el fascículo longitudinal medial (FLM) hacia motoneuronas en el núcleo motor ocular común (NMOC) que inervan el músculo recto interno a través del III par craneal (III par). En el esquema también se sitúan el lugar de registro (Registro), las bobinas perioculares (Bobina) para el seguimiento de los movimientos oculares y los electrodos de estimulación implantados (Est), al igual que el lugar lesionado (Ax) e implantado (Imp). **B**, Esquema del curso temporal (d, días) de los tratamientos y procedimientos experimentales. IHQ, inmunohistoquímica; MET, microscopía electrónica de transmisión; REG, registros electrofisiológicos. **C**, Potenciales de campo antidrómicos registrados en el NMOE antes de la lesión tras la estimulación eléctrica del VI par o del FLM. **D**, Igual que en C, pero tras la sección del FLM derecho y el implante de progenitores neurales. **E**, Test de colisión de una neurona internuclear del NMOE. A la izquierda, la activación antidrómica (punta de flecha) de la neurona internuclear desde el FLM falló cuando se produjo previamente un potencial de acción espontáneo (punto). A la derecha, ausencia de la colisión del potencial de acción ortodrómico (punto) tras estimular eléctricamente el VI par.

Para el registro de los movimientos oculares se siguió la técnica desarrollada por Fuchs y Robinson (1966). Se suturó, en cada globo ocular, una bobina de dos vueltas construida con un alambre de acero inoxidable de 250 μm de espesor, aislado con hilo de teflón (A-M systems, Sequim, Washington, EEUU). Los extremos de la bobina se pasaron bajo la piel hacia el hueso frontal. Estos extremos, así como los de los electrodos de estimulación, se soldaron al conector embebido en la torreta de resina acrílica (Figura 13, B). La torreta de cemento dental contuvo además una cámara situada sobre la ventana de registro, que se selló asépticamente entre las sesiones mediante una lámina de silicona estéril, una gasa empapada de gentamicina (Cusí, Barcelona, España), y un cierre de plástico. Una vez terminada la intervención quirúrgica, los animales se hidrataron mediante inyecciones subcutáneas de suero fisiológico y de glucosado. Se vigiló diariamente el estado del animal en el periodo post-operatorio, durante el que se limpiaron, en caso de ser necesario, la piel circundante a la torreta, los ojos y la zona periorbital con suero salino, corticosteroides (dexametasona, Cusí) y antibióticos (gentamicina, Cusí).

3.3. Registros extracelulares

Las sesiones de registro control comenzaron 10 días tras la cirugía. En cambio, las sesiones experimentales se iniciaron 4 días post-lesión, extendiéndose hasta un máximo de 75 días en el grupo de axotomía y de 77 días en el de implante, dependiendo de cada animal (Figura 12, B). Los animales se colocaron en una bolsa de tela y, tras situarlos en postura de reposo, se envolvieron con vendas elásticas. De esta manera, se introdujeron en una caja de metacrilato situada en el interior de un campo electromagnético para el registro de los movimientos oculares (Fuchs y Robinson, 1966), fijando su cabeza mediante los 3 tornillos implantados en la torreta a un soporte conectado a un sistema de barras metálicas unido a la mesa de registro, de modo que la cabeza del animal quedaba inclinada 22 grados hacia abajo. Con esta posición, se aseguró la estimulación adecuada de los canales semicirculares horizontales durante la rotación de la mesa de registro alrededor del eje vertical (Blanks y col., 1975). En la primera sesión de registro, se calibraron los movimientos oculares haciendo rotar la mesa con un motor servocontrolado a una amplitud de ± 20 grados y a una frecuencia de 0,125 Hz, induciendo así el reflejo vestibulo-ocular. Dado que en estas circunstancias la ganancia de este reflejo es 1 (Donaghy, 1980), se pudo determinar la relación voltio/grado para los movimientos oculares horizontales.

Los electrodos de registro se construyeron a partir de micropipetas de vidrio obtenidas de varillas (Pirex de Corning, Nueva York, EEUU) de 3 mm de diámetro externo y pared de 0,5

mm de espesor, que se fabricaron con un estirador de micropipetas (Narishige PE-2, Tokio, Japón). Se biseló la punta bajo un microscopio óptico hasta obtener un diámetro interno de 1-2 μm y una resistencia final de entre 1 y 5 $\text{M}\Omega$. Las micropipetas se llenaron con una solución electrolítica de NaCl 2M y se fijaron a un micromanipulador (ME-7, modelo Camberra, Narishige, Japón). La micropipeta se guio hacia 6 mm caudales y 1 mm lateral al cero estereotáxico (Berman, 1968), a través del cerebelo hacia el troncoencéfalo hasta una profundidad de 17-19 mm desde la superficie, con un ángulo de elevación de 3–5 grados con respecto al eje vertical, lo que proporcionó una inclinación anterior total de la micropipeta con respecto al plano horizontal de 25–27 grados. La localización final del NMOE se verificó al registrar el potencial de campo antidrómico producido al estimular eléctricamente el VI par craneal homolateral al sitio de registro (Figura 12, C; VI par), seguido por la activación antidrómica de las neuronas internucleares del NMOE tras la estimulación del FLM contralateral (Figura 12, C; FLM). Los registros se realizaron en el NMOE izquierdo, ya que los axones de las neuronas internucleares, que cruzan la línea media, se axotomizaron en el FLM derecho. El electrodo de registro se conectó a un preamplificador (Nex 1, Biomedical Engineering Co., Nueva York, EEUU) utilizando un alambre de plata, y desde ahí a un amplificador diferencial (Tektronix AM 502, Beaverton, Oregón, EEUU), donde la señal se acopló capacitivamente y se dirigió hacia un audiómetro (Cibertec, Madrid, España) y hacia una tarjeta de adquisición analógico/digital (CED Power 1401, Cambridge, Inglaterra), a la que también llegaron las señales procedentes de la mesa y de las bobinas periculares, y desde donde se dirigieron a un ordenador que permitió la adquisición y almacenamiento de todas las señales.

Las células registradas, neuronas internucleares del NMOE, se identificaron electrofisiológicamente gracias a su activación antidrómica desde el electrodo situado en el FLM, seguida por el test de colisión entre los potenciales de acción ortodrómico y antidrómico y finalmente por la ausencia de activación antidrómica tras la estimulación eléctrica del VI par (Figura 12, E; FLM). Las neuronas internucleares axotomizadas del NMOE se identificaron siguiendo los mismos criterios descritos previamente (de la Cruz y col., 2000): i) la localización dentro de los límites del potencial de campo antidrómico del NMOE inducido tras la estimulación del VI par (Figura 12, C; VI par); ii) el fallo de la activación antidrómica desde los electrodos dispuestos en el FLM y en el VI par (Figura 12, D, FLM; E, VI par); y iii) el patrón característico de la actividad neuronal en relación a los movimientos oculares horizontales que serán descritos a continuación.

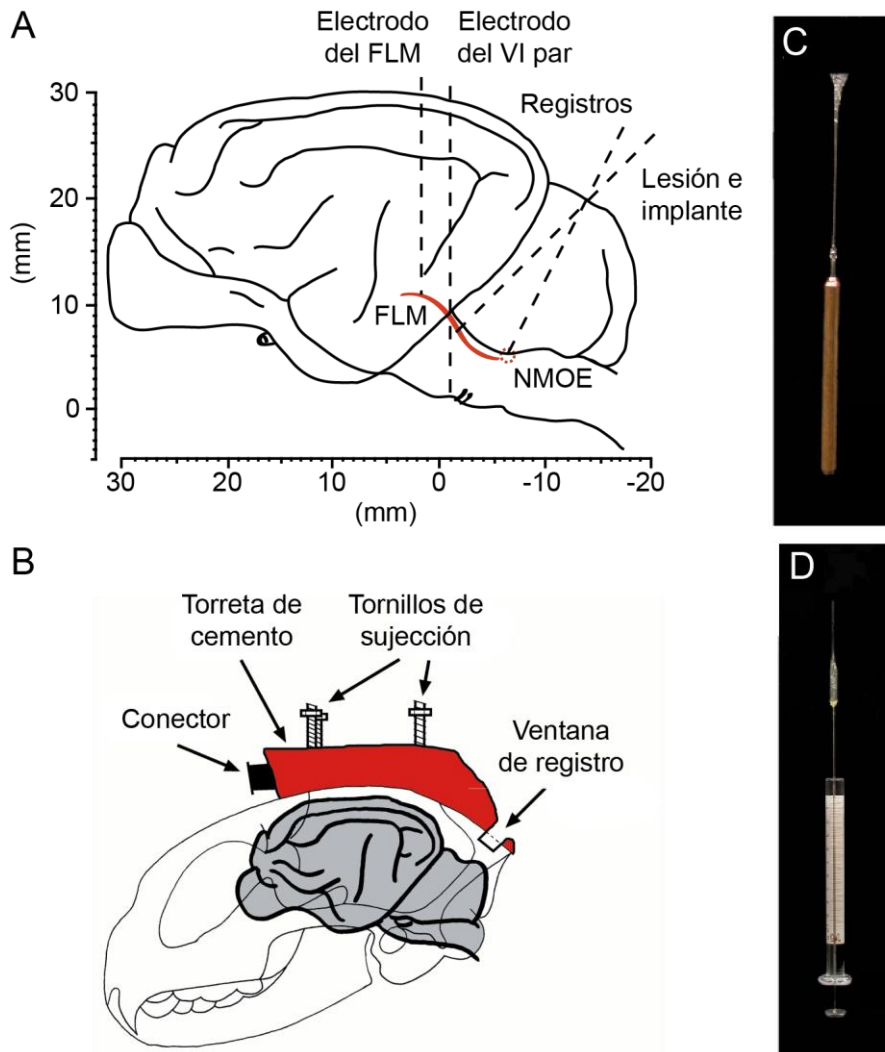


Figura 13. Preparación para el registro crónico, lesión e implante. **A**, Esquema sagital del encéfalo de gato donde se representan las coordenadas de los electrodos implantados (bilateralmente en el VI par craneal, -1 mm anteroposterior, $\pm 3,5$ mm lateral, 27 mm de profundidad; unilateralmente en el FLM derecho, 2 mm anteroposterior, -1 mm lateral, 20 mm de profundidad) junto a las trayectorias seguidas por la micropipeta de registro a través del cerebelo hasta el núcleo motor ocular externo (NMOE; 27 grados de inclinación rostral) y la microcuchilla (45 grados) que seccionó el FLM (según el atlas Berman, 1968). Como punto de referencia, se tomó el cero estereotáxico calculado previamente en el aparato. **B**, Representación de la torreta construida con cemento dental que se implantó sobre tornillos anclados al cráneo. Mediante un conector también embebido en el cemento, se conectaron los extremos de las bobinas periorbitales y de los electrodos implantados. El sistema de sujeción permitió hacer solidario el movimiento de la cabeza con el de la mesa de registro. Se ilustra también la ventana de acceso al cerebelo para los registros. **C**, Microcuchilla empleada para seccionar el FLM, con una hoja cortante de 2 mm de ancho. **D**, Jeringa Hamilton modificada con una micropipeta de vidrio acoplada en la punta utilizada para el implante de células.

3.4. Adquisición de datos y análisis

Tanto la posición ocular en los planos horizontal y vertical de ambos ojos, como la actividad neuronal relacionada, se adquirieron y almacenaron digitalmente para su posterior análisis. Los datos se seleccionaron con programas escritos en Matlab 6.5 (Mathworks, Natick, Massachusetts, EEUU) que permitieron asociar la frecuencia instantánea de disparo a las posiciones de ambos ojos. Las motoneuronas extraoculares, así como las neuronas internucleares del NMOE, codifican en su frecuencia de disparo la posición y la velocidad ocular. Se dice, por tanto, que su patrón de disparo es tónico-fásico. Así, emiten brotes de potenciales de acción precediendo a los movimientos rápidos o sacádicos en la dirección de activación (dirección *on*), su frecuencia de disparo disminuye abruptamente o cesa durante los sacádicos en la dirección *off*, y mantienen una tasa constante de disparo para fijaciones oculares, que es proporcional a la posición ocular, siendo la dirección de activación la homolateral al sitio de registro (Delgado-García y col., 1986a, b). Siguiendo este patrón, se establece que la frecuencia de disparo puede ser calculada según la siguiente función (Robinson, 1975):

$$FD = F_0 + k \cdot P + r \cdot V,$$

donde FD es la frecuencia de disparo, F_0 es la tasa de disparo cuando el ojo se encuentra en el centro de la órbita, P es la posición ocular, V es la velocidad ocular, y k y r son las sensibilidades neuronales a la posición y a la velocidad ocular, respectivamente. Es decir, la tasa de disparo es la suma de un componente tónico sensible a la posición ($k \cdot P$), más un componente fásico, sensible a la velocidad ($r \cdot V$), todo ello sumado a la constante F_0 , la tasa de disparo para la posición central (es decir, cero grados o mirada al frente). El umbral de reclutamiento (Um), es decir, la posición ocular a la cual es reclutada una neurona (y por tanto, comienza a disparar), puede ser inferida del cociente $-F_0 / k$.

Inicialmente, se seleccionaron fragmentos temporales de fijaciones oculares junto con la frecuencia de disparo simultánea de la célula registrada para exportarlos al programa de análisis. Se evitaron los 300 ms que siguieron a los movimientos sacádicos, para eludir la caída postsacádica en el disparo (Delgado-García y col., 1986a, b). Se seleccionaron fijaciones de manera que, en su conjunto, abarcaran el máximo rango de posiciones. Puesto que durante las fijaciones oculares, la velocidad ocular es cero, la ecuación indicada anteriormente queda expresada como $FD = F_0 + k \cdot P$. Por tanto, los datos de posición y de frecuencia de disparo adquiridos se correlacionaron mediante regresión lineal simple. Del ajuste así realizado, se obtuvieron los parámetros k , F_0 y el coeficiente de correlación de dicha regresión (R). En particular, se correlacionó la tasa de disparo (FD) en potenciales de acción por segundo (pa/s)

con la posición ocular (P , en grados), siendo k la pendiente de la recta de regresión resultante (k , en pa/s/grado), y el punto donde la recta corta al eje de ordenadas, F_o (pa/s).

El análisis de la sensibilidad neuronal durante los movimientos sacádicos se realizó correlacionando la velocidad ocular (V) durante los movimientos oculares en la dirección de activación o de inactivación, con brotes de potenciales de acción o decrementos en su disparo, respectivamente. Igualmente se procedió a seleccionar fragmentos temporales de sacádicos junto al disparo de la célula registrada, abarcando un amplio rango de sacádicos en términos de velocidad, amplitud y dirección. El análisis de regresión lineal correspondiente (FD frente a velocidad ocular) se llevó a cabo tras la sustracción del componente de posición ($k \cdot P$), calculado previamente al determinar la sensibilidad a la posición ocular. Por tanto, la ecuación usada fue $FD - k \cdot P = r \cdot V + F_o$, donde r (en pa/s/grados/s) se obtiene como la pendiente de la recta de regresión lineal y corresponde a la sensibilidad neuronal a la velocidad ocular (en grados/s).

Además, se realizó un análisis más detallado de ambas sensibilidades neuronales, calculando por separado los componentes *on* y *off* de las sensibilidades k y r , para lo cual se seleccionaron fijaciones o sacádicos discriminando entre movimientos oculares en la dirección de activación (*on*) o de inhibición (*off*) (Delgado-García y col., 1986a, b). En el cálculo de los parámetros $k\text{-off}$ y $r\text{-off}$, se excluyeron del análisis aquellas fijaciones y sacádicos en los que la tasa de disparo fue cero o disminuyó hasta cero.

Todos los cálculos de los distintos parámetros neuronales se basaron en los movimientos del ojo contralateral, ya que la sección del FLM causa la disimetría del ojo homolateral. Estudios previos controles han demostrado que no hay diferencias significativas entre las sensibilidades neuronales calculadas con el ojo homolateral o con el contralateral, dado el alto grado de conjugación de los movimientos oculares horizontales en el gato (de la Cruz y col., 2000).

En resumen, para cada neurona se obtuvieron una serie de parámetros relacionados con su señal de disparo oculomotora. A su vez, los datos se agruparon en las tres poblaciones definidas según la situación experimental: a) control, b) axotomía, y c) axotomía más implante (implante).

3.5. Cultivo de progenitores neurales y transfección viral

El presente trabajo es el primero que describe el empleo de progenitores neurales obtenidos de la zona subventricular de gatos neonatales (3 - 5 días post-natal). El material obtenido de un solo animal neonatal produjo células suficientes como para implantar a uno o dos gatos receptores adultos. Tras la decapitación y extracción del cerebro donante, se obtuvo una sección coronal a nivel de los ventrículos prefrontales, que se recogió en una placa de Petri con medio de cultivo Leibovitz L-15 (Invitrogen, Carlsbad, California, EEUU). Se diseccionaron las paredes laterales de los ventrículos, se trocearon y se sometieron a una digestión enzimática durante 15 minutos a 37°C con tripsina al 2,5% en una mezcla 1:1 de los medios Dulbecco's Modified Eagle Medium y Ham's F-12 (DMEM/F-12; Invitrogen). A continuación, el material se disgregó mecánicamente mediante una pipeta Pasteur de vidrio cuya punta se estrechó a la llama de un mechero, para su posterior centrifugación a 900 rpm. El precipitado se resuspendió en DMEM/F-12 enriquecido con suplemento B-27 (Invitrogen), GlutaMax™ (Invitrogen) y antibióticos (penicilina 100 U/ml y estreptomycin 100 µg/ml; Invitrogen). Tras la resuspensión se volvió a centrifugar a 900 rpm y por último, el precipitado se resuspendió en medio con la composición descrita anteriormente adicionado de factor de crecimiento epidérmico (EGF; 20 ng/ml; Invitrogen) y de factor de crecimiento de fibroblastos (FGF-2; 10 ng/ml; Millipore). La suspensión celular resultante se mantuvo en un incubador con (Nuair, Plymouth, Minnesota, EEUU) un 95% de O₂ y un 5% de CO₂, a 37 °C. Al cabo de 2-3 días, se pudieron observar agregados celulares esféricos, denominados neuroesferas, que se subcultivaron cada 48-72 horas hasta el momento de, o bien ser utilizadas para los implantes, o bien ser sembradas para el estudio de su diferenciación *in vitro* (Figura 14). Previo al implante, las neuroesferas se marcaron mediante dos sistemas diferentes, un colorante fluorescente lipofílico (PKH26; Sigma, San Luis, Misuri, EEUU; Gudiño-Cabrera y col., 2000), o bien mediante su transfección con un vector lentiviral que contenía el gen de la proteína fluorescente verde (GFP) bajo el control del promotor de citomegalovirus (título, 10⁷ unidades formadoras de placa/ml) con una multiplicidad de infección de 3. Para la transfección, las neuroesferas se mantuvieron en el incubador durante 8 h con su medio de cultivo habitual descrito anteriormente adicionado del virus. Pasado ese tiempo de incubación el medio se retiró y se reemplazó por medio fresco. Tras 48-72 horas de incubación, las células derivadas de las neuroesferas expresaron GFP y estuvieron listas para ser implantadas. A continuación, las neuroesferas se disgregaron mecánicamente y las células de la suspensión celular resultante se contaron utilizando una cámara de Neubauer. Este vector lentiviral, expresado en casi la totalidad de las células derivadas de las neuroesferas, permitió identificar y, por tanto, estudiar las características de las células progenitoras neurales implantadas mediante microscopía de fluorescencia y microscopía

electrónica de transmisión. El fenotipo de estas células no se vio afectado por la transfección lentiviral.

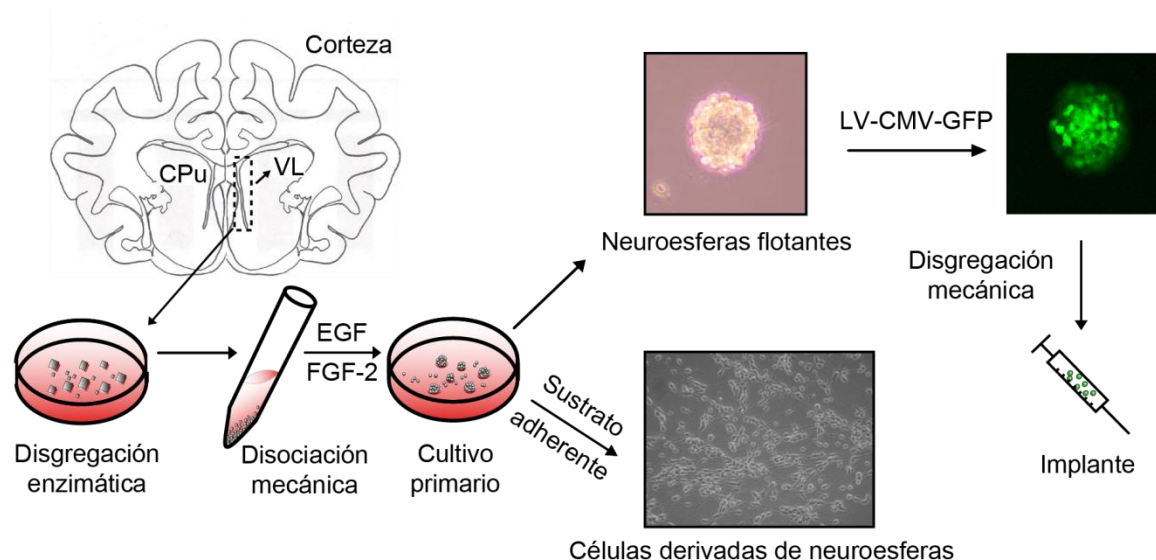


Figura 14. Obtención de progenitores neurales de la zona subventricular. Se diseccionaron asépticamente las zonas subventriculares de secciones coronales de gato (de 3 a 5 días postnatal) a nivel de los ventrículos laterales (VL), para someterlas a una disgregación enzimática y mecánica. La suspensión celular resultante se cultivó en presencia de los factores tróficos EGF y FGF-2, creciendo así las células en forma de neuroesferas flotantes. Para estudios de diferenciación, las células derivadas de estas neuroesferas se sembraron sobre un sustrato adherente (poli-D-lisina). Para su utilización en los implantes en gatos adultos axotomizados, las neuroesferas se transfectaron con vectores lentivirales (LV) que contenían el gen marcador de la proteína fluorescente verde (GFP) expresada bajo el control del promotor de citomegalovirus (CMV) [LV-CMV-GFP].

3.6. Sección del fascículo longitudinal medial

Los axones de las neuronas internucleares del NMOE cruzan la línea media a nivel del núcleo y cursan a través del FLM hacia el NMOC contralateral. Para la localización de este fascículo, se utilizaron electrodos de registro similares a los anteriormente descritos (véase sección 3.3). La micropipeta se dirigió estereotáxicamente a través de la ventana de registro, con un ángulo de 45 grados dirigido anteriormente hasta una profundidad de 19-20 mm desde la superficie cerebelosa, siguiendo las coordenadas 5,5 mm rostral al NMOE (esto es, 0,5 mm caudal al cero estereotáxico y 0,5-1 mm caudal al núcleo del IV par craneal; Berman, 1968). La localización definitiva del FLM se verificó al registrar axones vestibulares que ascienden por este tracto troncoencefálico e incrementan su tasa de disparo durante movimientos oculares dirigidos hacia abajo (Iwamoto y col., 1990). Se sustituyó entonces la micropipeta por una microcuchilla (un tubo de acero inoxidable al que se adhirió con cianoacrilato en su extremo final una lámina cortante; Figura 13, C) de 2,0 mm de anchura para seccionar el FLM derecho a

nivel del puente rostral (Pastor y col., 2000), siguiendo las coordenadas descritas. Se colocó el borde izquierdo de la cuchilla en la línea media y se descendió hasta una profundidad de 21 mm (1 mm por debajo de la localización del fascículo para asegurar la lesión completa), de forma que se seccionó únicamente el FLM derecho, produciendo la axotomía unilateral de las neuronas internucleares del NMOE izquierdo (Figura 13, A). La histología evidenció la lesión a 0,5 – 1 mm caudal al núcleo troclear, situado a una profundidad de 2 – 2,5 mm bajo la superficie ventricular en todos los animales así tratados.

3.7. Implante de progenitores neurales

En aquellos animales destinados a recibir un implante además de la lesión, inmediatamente tras la sección del FLM derecho, se inyectaron los progenitores neurales con una micropipeta acoplada a la punta de una jeringa Hamilton siguiendo las mismas coordenadas de la lesión (Figura 13, A y D). La inyección se realizó lentamente, en el transcurso de un minuto y en un tracto ascendente de 1,0 mm a la profundidad calculada del FLM, inyectando 1,0 μ l total de una suspensión celular conteniendo 50×10^3 células provenientes de neuroesferas disgregadas mecánicamente y teñidas con PKH26 o con expresión de GFP tras su transfección con el virus. La jeringa permaneció en esta localización durante un minuto más antes de ser retirada con cuidado de no arrastrar las células inyectadas.

3.8. Trazado anterógrado

En la última sesión de registro, dos animales recibieron en el NMOE afectado (lado izquierdo) una inyección electroforética de un marcador anterógrado (biotina dextrano amina, BDA; Invitrogen) para hacer visibles los cabos proximales de los axones seccionados de las neuronas internucleares del NMOE. Para ello, se rellenaron micropipetas con un diámetro en la punta de 20 - 25 μ m, con BDA al 3% diluido en tampón Tris-HCl (0,05 M) y pH 7,4. Se aplicaron pulsos de corriente catódica de 7 μ A de intensidad (en ciclos de 7 s de duración) durante 20 minutos y en tres localizaciones distintas rostro-caudalmente dentro de los límites del NMOE contralateral al FLM seccionado. Una semana después, los animales se anestesiaron de forma terminal (pentobarbital sódico, 100 mg/kg, i.p.) y se perfundieron transcardíacamente. El fijador fue paraformaldehído al 4% en tampón fosfato 0,1M, pH 7,4. Posteriormente, se obtuvieron secciones parasagittales de 50 μ m de grosor con un vibratomo, que se recogieron en tampón fosfato salino (PBS, pH 7,4). El trazador se reveló tras incubar las secciones durante una noche con estreptoavidina-TRITC (1:500; Jackson ImmunoResearch, West Grove, Pensilvania, EEUU)

preparada en PBS con un 1% de tritón 100X (PBS-T). Tras lavar el excedente, las secciones se montaron en portaobjetos y se prepararon para su observación mediante microscopía de fluorescencia.

3.9. Perfusión por vía transcardíaca

Para este procedimiento, los animales se anestesiaron previamente con clorhidrato de ketamina mezclado con xilacina (i.m.) para, a continuación, administrarles una dosis letal de pentobarbital sódico (100 mg/kg, i.p.). Mediante una incisión longitudinal paralela al esternón, se accedió a la caja torácica y al diafragma. Con ayuda de unas tijeras, el corazón quedó expuesto al retirar el pericardio. Se inyectó entonces intracardiácamente heparina como anticoagulante (8,5 mg/kg). Posteriormente, se introdujo un catéter a través de una incisión realizada en el ventrículo izquierdo que se dirigió hasta la aorta, fijando su posición con una pinza mosquito. Para permitir el drenaje se realizó entonces un corte en la aurícula derecha. En primer lugar, se perfundió con una solución salina isotónica (0,9 %, 1 litro) seguida por el fijador, paraformaldehído al 4% en tampón fosfato 0,1M, pH 7,4 (2 litros). Posteriormente, se obtuvieron secciones tanto parasagitales (a nivel de la lesión en el FLM), como coronales (incluyendo el NMOE), de 50 μ m de grosor con un vibratomo, que se recogieron en PBS. Las peculiaridades de este procedimiento para la preparación de los animales destinados a microscopía electrónica se describirán en la sección 3.13 de este capítulo.

3.10. Procedimientos inmunohistoquímicos para microscopía confocal de fluorescencia

Los animales usados para el estudio inmunohistoquímico se procesaron 2 meses después de la lesión (Figura 12, B). Mediante el uso de un vibratomo, se obtuvieron secciones coronales del troncoencéfalo caudal de 50 μ m de grosor conteniendo el NMOE. Las secciones se lavaron primeramente en PBS-T, y tras el bloqueo de uniones inespecíficas con suero normal de burro al 10% en PBS-T durante 1 hora, se incubaron durante una noche a temperatura ambiente con la solución del anticuerpo primario preparada en PBS-T con 5% de suero normal de burro y 0,05% de azida sódica. Los marcajes realizados fueron dobles, triples ocasionalmente, combinados de la siguiente manera: calretinina (un marcador de las neuronas internucleares del NMOE; de la Cruz y col., 1998), junto a: i) sinaptofisina (un marcador de botones sinápticos); ii) el transportador vesicular de GABA y glicina (VGAT) para botones sinápticos inhibitorios (González-Forero y col., 2004); y/o iii) la proteína glial fibrilar ácida (GFAP) para la identificación de

astrocitos. Los anticuerpos primarios usados fueron los siguientes: calretinina [anticuerpo policlonal (pAb) de cabra, 1:500; Swant, Suiza], sinaptofisina [anticuerpo monoclonal (mAb) de ratón, 1:2000; Millipore, Darmstadt, Alemania], VGAT (pAb de conejo, 1:500; Millipore) y GFAP (pAb de conejo, 1:500; DAKO, Glostrup, Dinamarca). Tras varios lavados, el tejido se incubó en una solución conteniendo los anticuerpos secundarios con los fluoróforos adecuados durante 2 horas (preparada en PBS-T, a 1:50 - 1:100; Jackson ImmunoResearch). Todo el protocolo inmunocitoquímico se hizo a temperatura ambiente y en agitación suave. Tras varios lavados, las secciones se montaron sobre portaobjetos y se cubrieron con medio de montaje Vectashield (Vector Laboratories, Burlingame, California, EEUU). Además, se procesaron secciones parasagittales del troncoencéfalo rostral conteniendo la lesión y el sitio del implante en el FLM, mediante inmunocitoquímica para GFAP, sinaptofisina o doblecortina (un marcador de neuronas inmaduras; Cooper-Kuhn y Kuhn, 2002), usando para la doblecortina un pAb primario hecho en cabra (1:100; sc-8066, Santa Cruz Biotechnology, Dallas, Texas, EEUU), seguido de los anticuerpos secundarios adecuados (Tabla 1).

Las imágenes (1024 X 1024 píxeles) se capturaron con un microscopio confocal (TCS SP2, Leica, Wetzlar, Alemania) y se analizaron con el programa ImageJ (NIH, Bethesda, Maryland, EEUU). La escala de grises se ajustó a su máximo rango dinámico. Las neuronas se fotografiaron en 1-4 planos focales diferentes conteniendo el núcleo en el eje z (objetivo 63X). Se midieron alrededor de los somas de las neuronas internucleares, identificadas como calretinina-inmunopositivas los siguientes parámetros (Pastor y col., 1997): i) su cobertura sináptica total (expresada como el porcentaje del perímetro somático ocupado por botones inmunorreactivos a sinaptofisina); ii) su cobertura sináptica inhibitoria, calculada igualmente pero usando VGAT en lugar de sinaptofisina; y iii) su cobertura astrocítica (porcentaje del perímetro somático ocupado por procesos GFAP inmunorreactivos). También se midió el valor de gris promedio en el neuropilo del NMOE inmunomarcado contra sinaptofisina, VGAT o GFAP, usando cuadrados de 80 píxeles de lado (25,8 μm) en imágenes adquiridas con el objetivo 40X, con el fin de cuantificar la intensidad de cada inmunomarcaje en forma de densidad óptica a nivel del neuropilo del NMOE (principalmente dendritas) mediante el empleo del mismo programa.

Para la inmunocitoquímica del VEGF en las células implantadas, se usó un pAb primario hecho en conejo (1:50; sc-507, Santa Cruz Biotechnology). Flk1, el receptor principal del VEGF, se visualizó en las neuronas internucleares del NMOE (identificadas con calretinina) mediante el uso de un anticuerpo monoclonal hecho en ratón (1:1000; sc-6251, Santa Cruz Biotechnology) específico para neuronas (Ruiz de Almodovar y col., 2011).

Tabla 1. Anticuerpos usados en las tinciones inmunocitoquímicas

Marcador	Utilidad	Anticuerpo primario	Dilución	Anticuerpo secundario y marca fluorescente (Jackson Immuno-Research)	Dilución (en secciones encefálicas/en cultivos)
Calretinina	Marcador de neuronas internucleares del NMOE	Cabra anti-calretinina (Swant)	1:500	TRITC-burro anti-cabra (rojo)	1:50
Doblecortina	Marcador de neuronas inmaduras	Cabra anti-doblecortina (Santa Cruz)	1:100	Cy5-burro anti-cabra (infrarrojo*)	1:50/1:200
Flk1	Receptor de VEGF	Ratón anti-Flk1 (Santa Cruz)	1:1000	FITC-burro anti-ratón (verde)	1:50
GFAP	Marcador de astrocitos	Conejo anti-GFAP (DAKO)	1:500	TRITC/Cy5-burro anti-conejo (rojo/infrarrojo*)	1:50/1:200
NG-2	Marcador de precursores de oligodendrocitos	Conejo anti-NG-2 (Millipore)	1:400	TRITC-burro anti-conejo (rojo)	1:200
Sinaptofisina	Marcador de botones sinápticos	Ratón anti-sinaptofisina (Millipore)	1:2000	FITC-burro anti-ratón (verde)	1:50
VEGF	Factor de crecimiento del endotelio vascular	Conejo anti-VEGF (Santa Cruz)	1:50	FITC-burro anti-conejo (verde**)	1:200
VGAT	Marcador de botones sinápticos inhibitorios	Conejo anti-VGAT (Millipore)	1:500	FITC-burro anti-conejo (verde)	1:50
β -III tubulina	Marcador de neuronas	Ratón anti- β -III tubulina (Promega)	1:500	TRITC-burro anti-ratón (rojo)	1:200

*La señal infrarroja de Cy5 fue visualizada en azul.

**La señal verde de FITC fue visualizada en blanco en la tinción de VEGF.

3.11. Inmunocitoquímica en cultivos de neuroesferas

Para analizar la capacidad de las células derivadas de neuroesferas de generar diferentes líneas neurales, se realizó una disgregación mecánica de las mismas con pipetas Pasteur de punta estrechada a la llama, y las células resultantes se sembraron en cubreobjetos tratados con poli-D-lisina para mejorar la adhesión (Sigma, 0,5 mg/ml) en DMEM/F-12 suplementado con B-27, GlutaMax™, antibióticos, EGF y FGF-2. Tras 48 horas de incubación, las células se fijaron con paraformaldehído al 4% en PBS 0,1M durante 10 minutos. En otros experimentos, las neuroesferas se sembraron sin disgregar y se fijaron inmediatamente tras las primeras 4 horas de adhesión al sustrato. La fijación finalizó con lavados de PBS, tras los cuales, se aplicó un bloqueo con una solución de albúmina sérica bovina al 2,5% en PBS durante 30 minutos. A continuación, se realizó el procesamiento inmunocitoquímico que incluyó las siguientes combinaciones de anticuerpos primarios: β III-tubulina, un constituyente proteico de microtúbulos usado selectivamente para discriminar neuronas (hecho en ratón, mAb, 1:500; Promega, Madison, Wisconsin, EEUU); doblecortina, una proteína asociada a microtúbulos expresada casi exclusivamente por neuronas inmaduras (hecho en cabra, pAb, 1:500; DAKO); y proteoglicano condroitín sulfato NG-2, un marcador de precursores de oligodendrocitos (hecho en conejo, pAb, 1:400; Millipore). Los anticuerpos secundarios usados fueron todos producidos en burro y estuvieron conjugados con diferentes cianinas para una separación cromática de las inmunorreacciones (1:200; Jackson ImmunoResearch). Los tiempos de incubación fueron de 2 horas y 30 minutos para los anticuerpos primarios y secundarios, respectivamente. También se realizaron contratincciones con 4', 6' -diamidino-2-dihidrocloruro fenilindol (DAPI; 0,1 μ g/ml, 10 minutos de incubación) para el marcaje de los núcleos celulares. La señal de fluorescencia se adquirió y analizó mediante un microscopio de epifluorescencia Olympus BX61 (Olympus, Hamburgo, Alemania).

3.12. Hibridación *in situ* para la detección de ARNm de factores tróficos

La hibridación *in situ* con sondas de oligonucleótidos se realizó en neuroesferas derivadas de la zona subventricular de gatos neonatales. Para ello las neuroesferas se sembraron en cubreobjetos tratados con poli-D-lisina en medio DMEM/DF-12 suplementado con suero fetal bovino al 1% durante 4 horas. Posteriormente, se fijaron durante 5 minutos con paraformaldehído al 4%, se deshidrataron progresivamente y se preservaron en etanol al 95%. Las hibridaciones *in situ* se llevaron a cabo siguiendo el protocolo de Wisden y Morris (2002) con pequeñas modificaciones descritas previamente en Morcuende y col., 2011,. Se sintetizaron sondas de oligonucleótidos complementarias a secuencias del ARNm de BDNF, NGF, NT-3 o

VEGF (Sigma), marcadas radioactivamente con $\alpha^{35}\text{-S-dATP}$ (GE Healthcare Life Sciences, Uppsala, Suiza) en el extremo 3' mediante deoxirribonucleotidil transferasa terminal (Promega). La actividad específica de las sondas marcadas osciló entre 200.000 y 300.000 cpm/ μl . Las secuencias antisentido de ADN empleadas fueron las siguientes: ARNm de BDNF, 5'-CCA TGG GAT TAC ACT TGG TCT CGT AGA AAT ATT GCT TCAGTT GGC-3' (número identificativo NM_012513, bases 1190–1234; Maisonpierre y col., 1991); ARNm de NGF, 5'-TGC GGG CTC TGC GGA GGG CTG TGT CAAGGGAAT GCT GAA GTT TAG T-3' (número identificativo M36589, bases 401–446; Whittimore y col., 1988); ARNm de NT-3, 5'-TCA ATC CCC CTG CAA CCG TTT TTG ACT GGC CTG GCT TCT TTACA-3' (número identificativo M34643, bases 658–701; Ernfors y col., 1990); ARNm de VEGF: 5'-CAC ATC TGC AAG TAC GTT CGT TTA ACT CAA GCT GCC TCG CCT TGC-3' (número identificativo NM_001110336, bases 581–625; Conn y col., 1990). A pesar de que las secuencias nucleotídicas de las neurotrofinas o del VEGF de gato no se conocen completamente, una búsqueda en GenBank reveló que las secuencias usadas en este trabajo están altamente conservadas en rata, ratón y humano (Lein y col., 2000).

La visualización y el análisis de las células tras el procedimiento de hibridación *in situ* se llevó a cabo mediante microscopía de campo claro (microscopio Axiophot, Zeiss, Oberkochen, Alemania). Se excluyeron del análisis aquellas células con una cantidad de granos de plata inferior a la del fondo de la preparación.

3.13. Microscopía electrónica

Dos meses después de la lesión e implante, los animales se prepararon para el análisis mediante microscopía electrónica (Figura 13, B). La perfusión intracardiaca consistió en un breve lavado con solución salina fisiológica seguido de una fijación con paraformaldehído al 4% y glutaraldehído al 0,3% en tampón fosfato, pH 7,4 (se pinzó la vena cava descendente con una pinza mosquito, siendo suficiente 1 litro de fijador). Se aisló el troncoencéfalo y se cortó en secciones parasagitales de 100 μm mediante el uso de un vibratomo. Para el procesado en preinclusión de GFP, las secciones seleccionadas en función de su señal fluorescente verde (marcador presente en los progenitores neurales, descrito anteriormente en la sección 3.5), se sometieron a tres ciclos de congelación-descongelación con vapores de nitrógeno líquido para permeabilizar el tejido, tras lo cual, se inició un procedimiento estándar de inmunohistoquímica con una incubación durante una noche en el anticuerpo primario anti-GFP producido en ratón (1:2000; Millipore), seguida, tras varios lavados, de la incubación durante 2 horas en la solución conteniendo el anticuerpo secundario (anticuerpo biotinilado anti-ratón desarrollado en cabra; 1:250; Vector Laboratories). La biotina se reveló mediante el complejo avidina-biotina (ABC Kit,

Vector Labs), usando 3,3'-tetrahidroclorhidrato de diaminobencidina (DAB) como cromógeno. Las secciones se post-fijaron en tetróxido de osmio al 1% durante 2 horas y se contrastaron con acetato de uranilo. Posteriormente se deshidrataron y se incluyeron en resina Durcupan ACM (Sigma). Mediante ultramicrotomía se obtuvieron secciones ultrafinas que se colocaron sobre rejillas de oval de 2x1 mm recubiertas con una película Formvar (preparada al 1% en cloroformo) y se examinaron posteriormente en un microscopio electrónico de transmisión (CM10, Philips, Ámsterdam, Países Bajos).

El procedimiento seguido para la tinción inmunohistoquímica post-inclusión de GFAP en las secciones ultrafinas se adaptó de un protocolo previo (de la Cruz y col., 1992). Las secciones ultrafinas se incubaron durante 2 horas en anticuerpo primario de conejo anti-GFAP (1:500; DAKO). El anticuerpo secundario usado fue de cabra anti-conejo conjugado con partículas de oro coloidal de 10 nm (1:30, durante 2 horas; Sigma). Se aplicó un método de intensificación con plata de las partículas de oro previamente a la contratinción con citrato de plomo y acetato de uranilo (Danscher y Zimmer, 1978).

Finalmente, es importante indicar que tanto los cultivos de progenitores neuronales, como la observación y adquisición de imágenes mediante microscopía confocal y electrónica se realizaron en los Servicios Centrales de la Universidad de Sevilla (CITIUS).

3.14. Estadística

Las comparaciones entre grupos se llevaron a cabo mediante el test ANOVA para uno o dos factores, seguido de una comparación múltiple *post hoc* usando el método Holm-Sidak con un nivel de significación de 0,05, mediante el programa SigmaPlot 11 (Systat Software GMBH). Los valores de los distintos datos numéricos se expresaron como la media \pm el error estándar de la media, salvo que se indique lo contrario.

RESULTADOS

4. RESULTADOS

4.1. Multipotencialidad de los progenitores neurales

En este estudio se demuestra por primera vez que los progenitores neurales aislados de la zona subventricular de gatos postnatales pueden ser amplificados *in vitro*, preservando su multipotencialidad y conservando su capacidad de síntesis de factores neurotróficos. Estas células progenitoras se cultivaron como neuroesferas flotantes, lo que permitió su amplificación, y se diferenciaron en los distintos tipos de células de la estirpe neural al ser subcultivadas sobre un sustrato adherente. Así, tras 48 horas de su siembra en condiciones que favorecen la diferenciación celular, las células provenientes de las neuroesferas expresaron el marcador de astrocitos GFAP (Figura 15, A y C), los marcadores neuronales β -III tubulina (Figura 15, B y C) o doblecortina y/o el marcador de precursores de oligodendrocitos NG-2. Incluso tan sólo 4 horas tras la adhesión al sustrato, algunas de las células derivadas de las neuroesferas comenzaron a diferenciarse (Figura 15, D; marcadas contra NG-2).

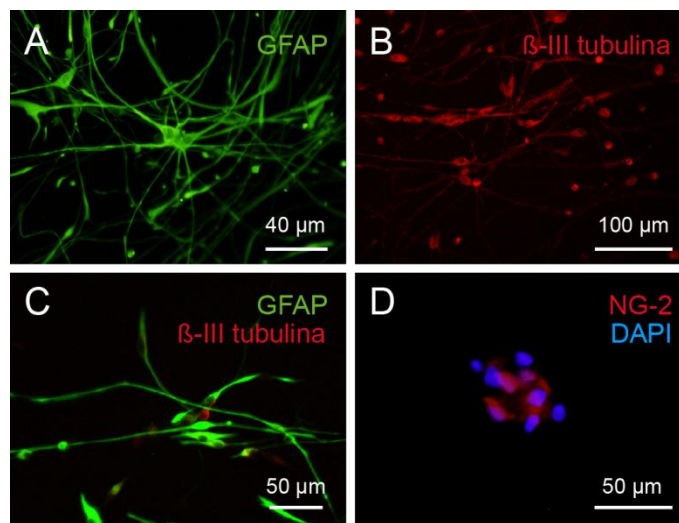


Figura 15. Caracterización fenotípica de las células progenitoras neurales *in vitro*. A-D, Las células derivadas de neuroesferas sembradas sobre un sustrato adherente (poli-D-lisina) se diferencian a células de la estirpe neural expresando marcadores de astrocitos (GFAP, verde, **A** y **C**), de neuronas (β -III tubulina, rojo, **B** y **C**) y de precursores de oligodendrocitos (NG-2, rojo, **D**). En azul, en **D**, se muestra una contraindicación con DAPI para la visualización de los núcleos celulares.

Mediante hibridación *in situ* se demostró también que las células derivadas de las neuroesferas expresaron ARNm de los factores tróficos NGF (Figura 16, A), NT-3 (Figura 16, B) y VEGF (Figura 16, C), aunque no el ARNm de BDNF (datos no mostrados). La expresión del ARNm de NGF fue significativamente inferior a la de los factores tróficos NT-3 y VEGF, cuyos niveles fueron a su vez similares entre sí (Figura 16, D).

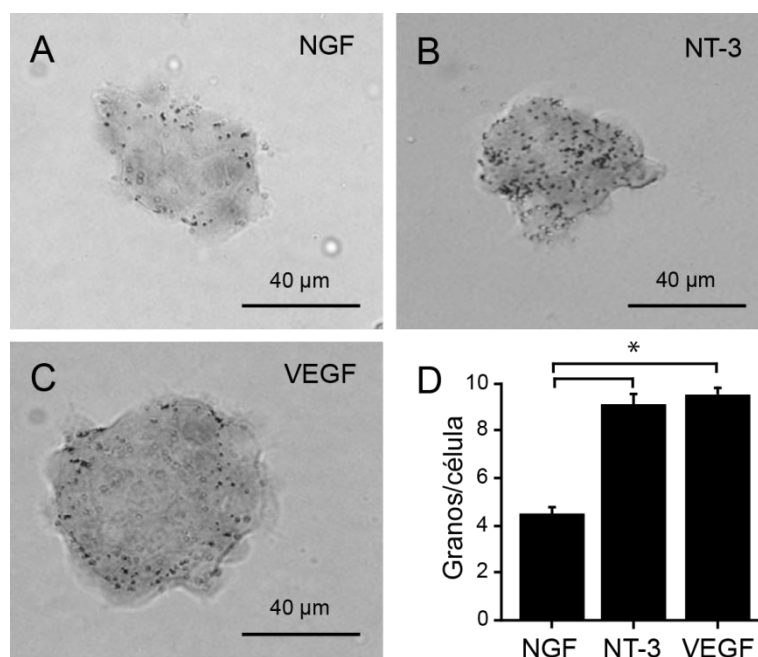


Figura 16. Expresión del ARNm de factores tróficos en células progenitoras neurales *in vitro*. A-C, Hibridación *in situ* realizada en neuroesferas obtenidas de gatos postnatales en las que la tinción de los granos de plata muestra la expresión del ARNm de NGF (A), NT-3 (B) y VEGF (C). D, Diagrama de barras que representa el número medio de granos de plata cuantificados por célula ± el error estándar de la media para el ARNm de los factores tróficos NGF ($n = 59$ células), NT-3 ($n = 56$ células) y VEGF ($n = 203$ células). Las diferencias significativas respecto a NGF se muestran mediante * ($p < 0,05$; test ANOVA, método Holm-Sidak para comparaciones múltiples).

4.2. Interacción implante-hospedador

Los progenitores neurales derivados de las neuroesferas se implantaron en gatos adultos a los que, previamente y en la misma sesión, se les seccionó el fascículo longitudinal medial del lado derecho. Las coordenadas estereotáxicas de localización del implante fueron las mismas empleadas para realizar la lesión (ver en las secciones 3.6 y 3.7). En este estudio, no se realizó un seguimiento temporal de la interacción implante-hospedador, sino que todos los datos morfológicos se obtuvieron a los 2 meses post-implante, periodo que se corresponde con el tiempo en el que se registraron la mayoría de las células. El aspecto del implante en el FLM lesionado al cabo de los 2 meses (Figura 17, A) fue el de una masa de células rodeada de procesos celulares acumulados a lo largo del tracto de la lesión (Figura 17, B-D). La

inmunohistoquímica contra GFAP evidenció los límites de la lesión (Figura 17, B). Las células implantadas desarrollaron unos procesos finos y largos que, en algunos casos, superaron los 500 μm de longitud (Figura 17, C y D).

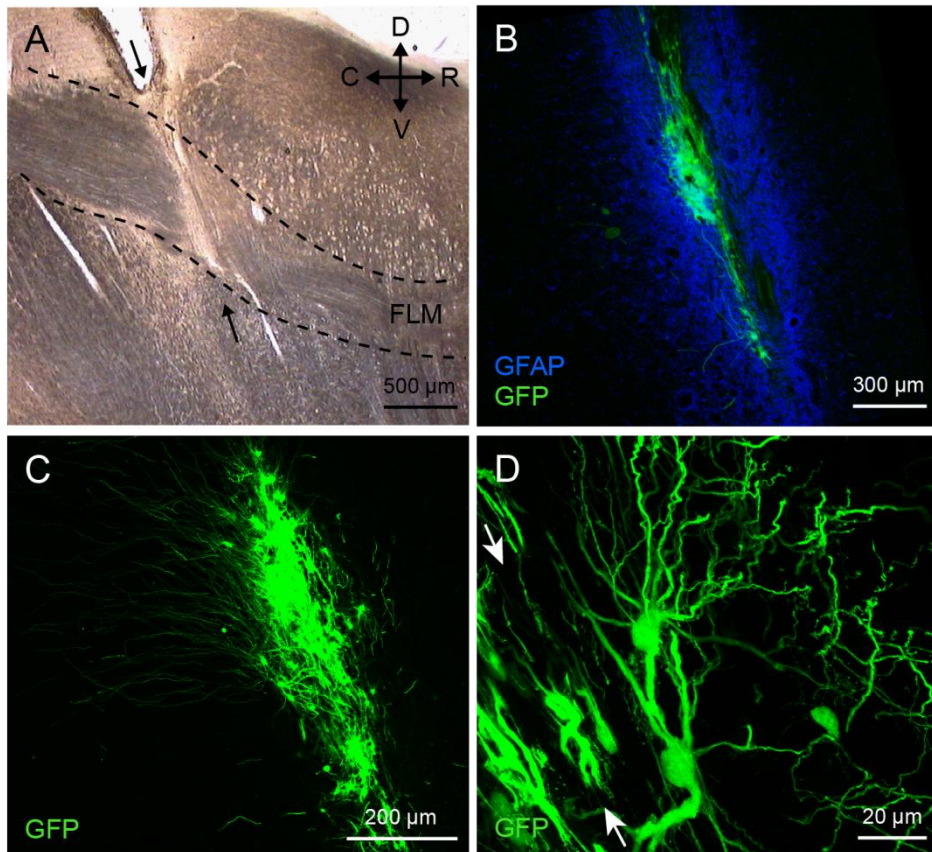


Figura 17. Interacción implante-hospedador. *A*, Sección parasagital del tronco del encéfalo de un gato adulto donde se muestra el lugar de la transección (flechas) del FLM (delimitado por líneas discontinuas). C, caudal; D, dorsal; R, rostral; V, ventral. *B-D*, Imágenes de microscopía confocal de células progenitoras neurales implantadas expresando GFP en el FLM lesionado. Nótese la presencia de una intensa reacción astrocítica en torno a la lesión, tal y como se muestra mediante un inmuno-marcaje contra GFAP (*B*; azul), y los procesos finos y abundantes de las células implantadas (*C* y *D*). Las flechas en *D* indican la localización de la lesión y el tracto del implante.

Además, las células implantadas exhibieron diversos fenotipos *in vivo* (estudio realizado en dos animales lesionados e implantados con progenitores neurales transfectados para su expresión de GFP):

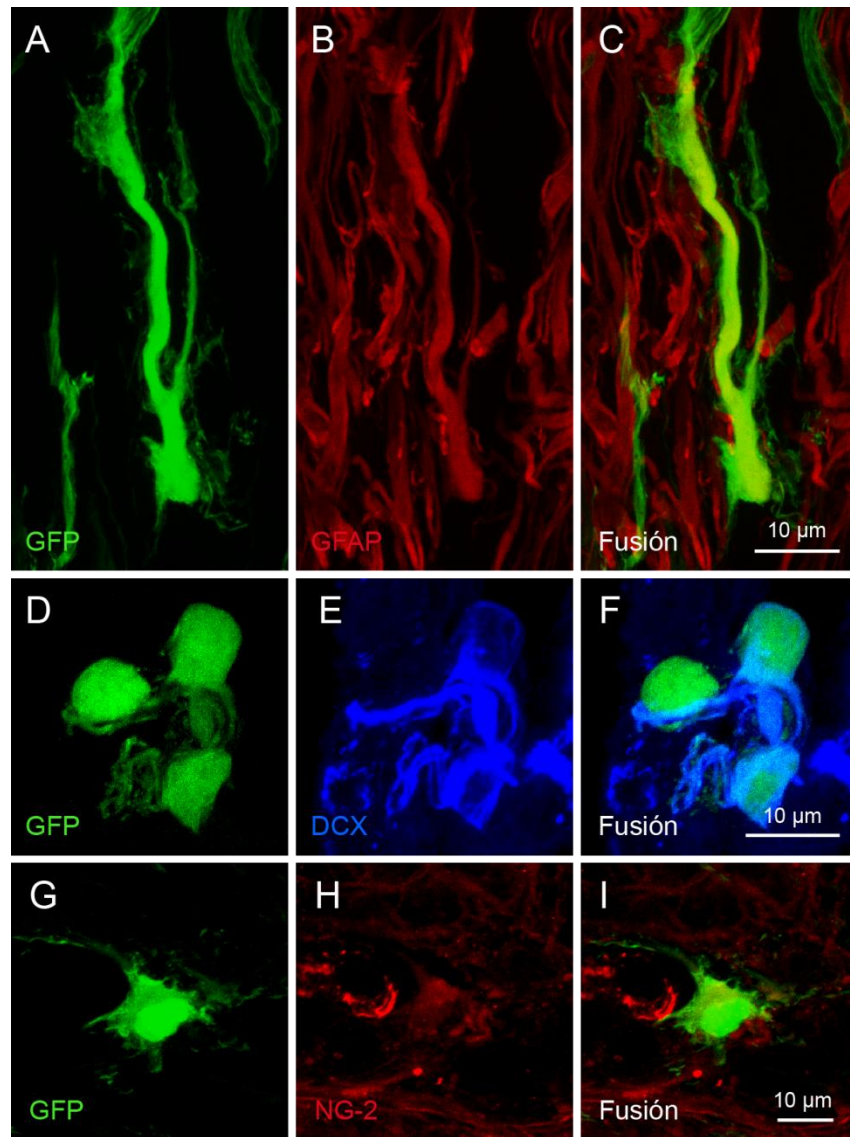


Figura 18. Caracterización fenotípica de las células progenitoras neurales implantadas. **A-C**, Imágenes de microscopía confocal de una célula progenitora neural implantada (GFP-positiva, **A**) diferenciada a astrocito (inmunorreactiva a GFAP, en rojo, **B**). **C**, imagen fusionada de A y B (Fusión). **D-F**, Imágenes de microscopía confocal de un grupo de células progenitoras neurales implantadas positivas a GFP (verde, **D**) que son inmunorreactivas para el marcador de neuronas inmaduras doblecortina (DCX, azul, **E**). **F**, imagen fusionada de D y E. **G-I**, Imágenes de microscopía confocal de una célula implantada (GFP-positiva, en verde, **G**) inmunorreactiva para el marcador de progenitores de oligodendrocitos NG-2 (rojo, **H**). **I**, superposición de las imágenes G y H.

- Se observó que un 10,4% de las células GFP-positivas fueron inmunorreactivas contra GFAP, marcador de astrocitos (Figura 18, A-C).
- Aproximadamente, un 6% de las células implantadas reaccionaron contra doblecortina, marcador de neuronas inmaduras (Figura 18, D-F).
- Se detectó el marcador neuronal β -III tubulina en un 5,5% de las células implantadas (datos no ilustrados).
- Una proporción menor de las células (2,6%) mostró una señal inmunocitoquímica contra NG-2, un marcador de precursores de oligodendrocitos (Figura 18, G-I). Estos resultados indicaron unos niveles de diferenciación celular moderadamente bajos. Esto es, la mayoría de las células implantadas no se diferenciaron hacia ningún fenotipo particular (neuronal o glial) sino que permanecieron en estado indiferenciado.

La interacción entre el implante y el tejido hospedador se estudió mediante el trazado anterógrado con BDA inyectada en el NMOE contralateral al fascículo lesionado (FLM derecho), lo que marcó los axones seccionados de las neuronas internucleares del NMOE (izquierdo). Se pudo apreciar una íntima relación entre los axones lesionados de las neuronas internucleares del NMOE y las células implantadas (Figura 19, A). En algunos casos, se observaron aposiciones cercanas, sugerentes de contactos sinápticos, entre los terminales axónicos (marcados con sinaptofisina) y células implantadas identificadas como GFP-positivas (Figura 19, B).

Por otro lado, se evaluó la presencia de VEGF en los progenitores neurales implantados. La razón es que este factor juega un papel relevante en la regulación de la neurogénesis de las células progenitoras neurales de la ZSV (Calvo y col., 2011) y, además, datos previos obtenidos en el laboratorio usando el mismo modelo experimental, pero en la rata, indicaron que el VEGF se ve incrementado en las neuronas internucleares del NMOE axotomizadas y expuestas al implante (Talaverón y col., 2013). Para la detección del VEGF, se realizaron tinciones inmunohistoquímicas en secciones parasagittales del troncoencéfalo que incluyeron el lugar de la lesión en el FLM y el implante. Los datos obtenidos revelaron que un 68% de las células implantadas GFP-positivas presentaron también señal inmunorreactiva contra VEGF (Figura 19, C). Además, se analizó si las neuronas internucleares del NMOE eran receptivas a este factor mediante doble inmunofluorescencia, frente a calretinina, para la identificación de las neuronas internucleares, y frente al receptor de VEGF, Flk1. En las tres situaciones experimentales (control, axotomía e implante) se detectó que todas las células inmunopositivas a calretinina en el NMOE expresaron el receptor Flk1 (Figura 19, D). Estos datos indicaron, por tanto, que el

VEGF está presente en las células implantadas y podría ser captado por los terminales axónicos de las neuronas internucleares del NMOE y actuar como un factor neurotrófico retrógrado.

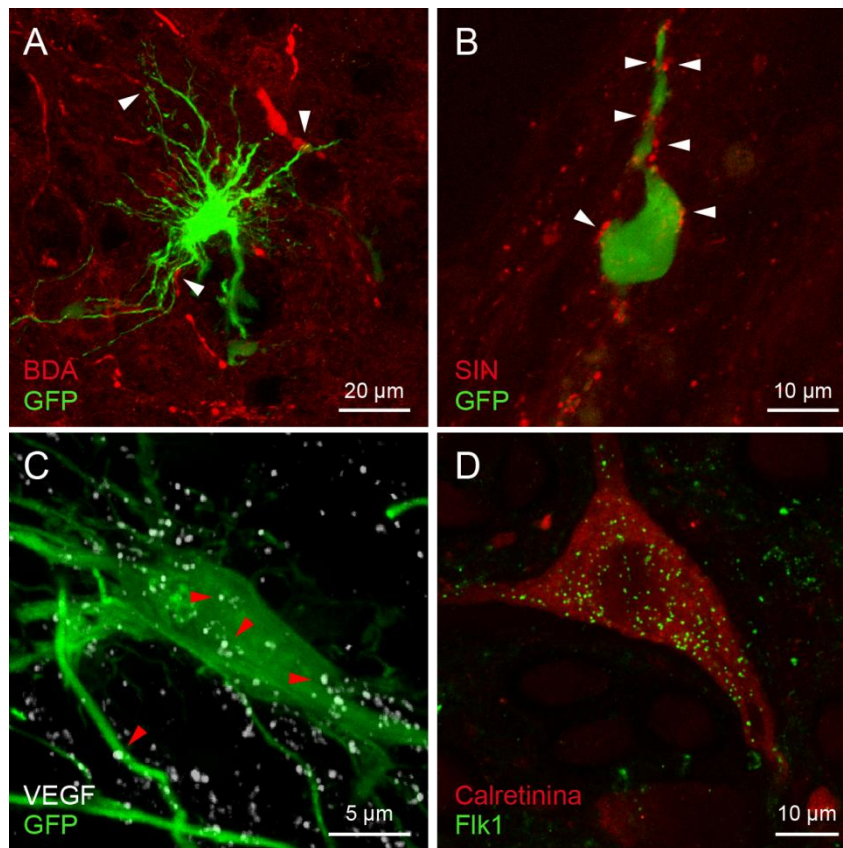


Figura 19. Interacciones de las células progenitoras neurales implantadas y las neuronas internucleares del NMOE. **A**, Ejemplo de la íntima asociación (puntas de flecha) entre los axones de las neuronas internucleares del NMOE (marcados anterógradamente con BDA, en rojo) y una célula progenitora neural implantada (con expresión de GFP, verde). La imagen es la superposición de 14 planos focales de 2 µm de grosor. **B**, Botones sinápticos (inmunorreactivos a sinaptofisina, SIN, en rojo) en cercana aposición (puntas de flecha) al cuerpo celular y a los procesos de otra célula implantada identificada en verde por su expresión de GFP. **C**, Presencia de VEGF (en blanco; las puntas de flecha señalan algunos puntos inmunorreactivos) en células progenitoras neurales implantadas (con expresión de GFP, en verde). **D**, Ejemplo de una neurona internuclear del NMOE de un animal implantado, identificada como inmuno-positiva a calretinina (rojo), en la que se aprecia señal inmunocitoquímica del receptor de VEGF, Flk1 (verde). Las imágenes **C** y **D** corresponden a la suma de 13 y 7 planos focales de 0,8 µm, respectivamente.

4.3. El implante de progenitores neurales previene las alteraciones en el disparo inducidas por la axotomía de las neuronas internucleares del NMOE

Las neuronas del NMOE disparan de forma tónica y fásica durante las fijaciones oculares y los movimientos sacádicos espontáneos horizontales, respectivamente (Delgado-García y col., 1986b). En la situación control, las neuronas internucleares del NMOE mostraron una tasa de descarga tónica regular correlacionada con la posición ocular durante las fijaciones oculares (Figura 20, A), incrementándose de manera proporcional a la amplitud de la rotación del ojo dirigida hacia el lado de registro, correspondiente a la dirección de activación o dirección *on*. De la misma manera, la tasa de disparo se redujo proporcionalmente a las posiciones del ojo dirigidas contralateralmente en relación al sitio de registro, esto es, la dirección de inactivación o dirección *off* (Figura 20, A). Por tanto, se pudo establecer una correlación entre la frecuencia de disparo y la posición ocular, de forma que la pendiente de la recta de regresión lineal resultante representó la sensibilidad neuronal a la posición ocular (k , medida en pa/s/grado; Figura 21, A y B; líneas y puntos negros). El punto en el que la recta de regresión intercepta la abscisa del gráfico se considera el umbral de posición ocular, en el cual la unidad es reclutada en actividad (Figura 21, A, U_m). Además, la frecuencia de disparo de las neuronas internucleares se correlacionó también con la velocidad ocular durante movimientos oculares rápidos o sacádicos, de manera que se produjeron brotes de alta frecuencia durante sacádicos en la dirección *on*, y pausas o decrementos abruptos en el disparo acompañando a los sacádicos *off* (Figura 20, A). La pendiente de la recta de regresión lineal obtenida de la correlación entre frecuencia de disparo y velocidad durante movimientos sacádicos correspondió a la sensibilidad neuronal a la velocidad ocular, denominada r , en pa/s/grado/s (Figura 22, A y B; líneas y puntos negros).

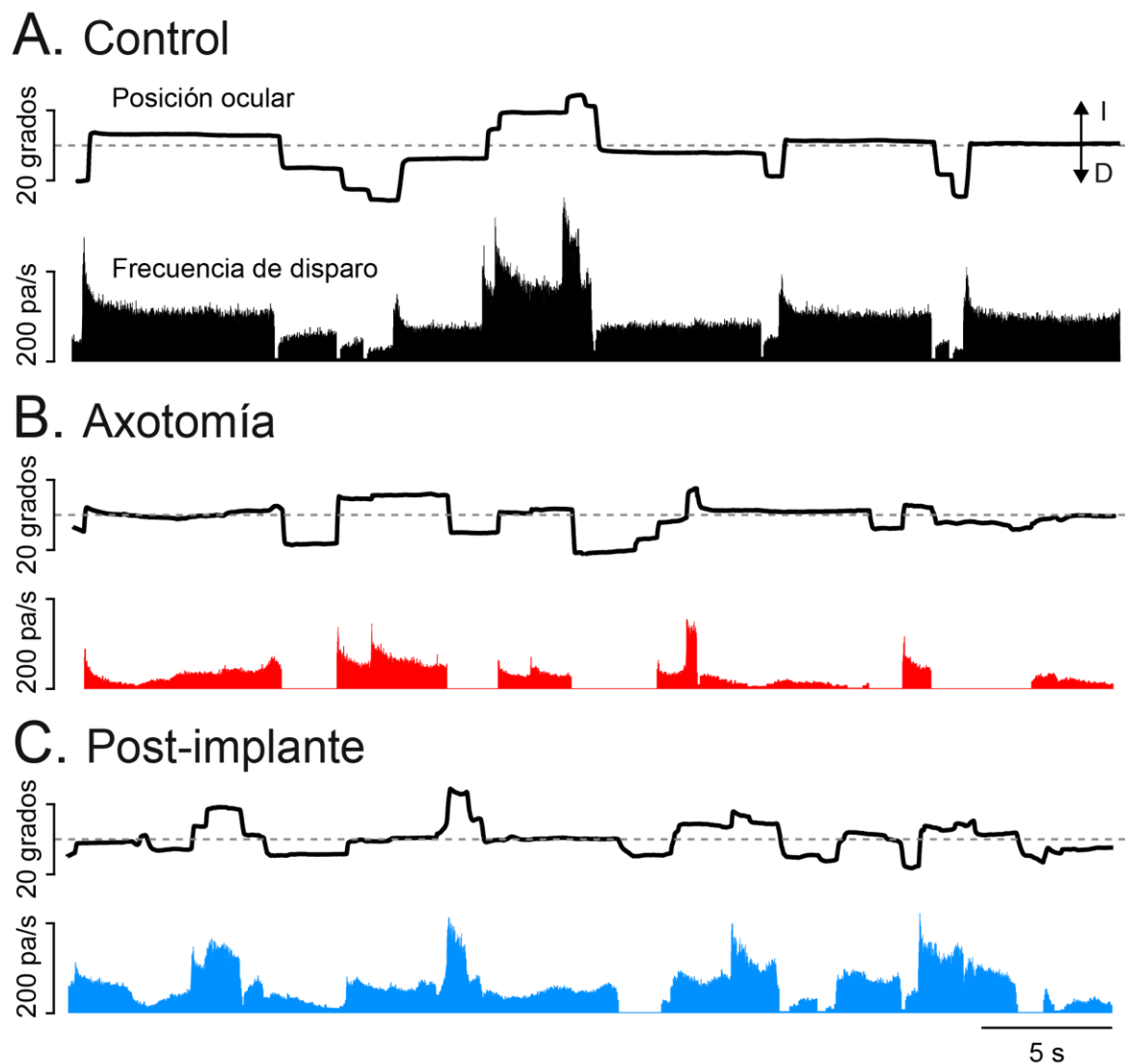


Figura 20. Efectos de la axotomía y del implante de células progenitoras neurales derivados de la ZSV en el patrón de disparo de las neuronas internucleares del NMOE. **A**, Frecuencia de disparo medida en potenciales de acción/s de una neurona internuclear control del NMOE durante movimientos oculares espontáneos (I y D, movimientos hacia la izquierda y hacia la derecha, respectivamente). **B**, Frecuencia de disparo de una neurona internuclear registrada 14 días después de la axotomía. Nótese la reducción en el patrón de disparo tanto en el componente tónico como en el fásico. **C**, Frecuencia de disparo de una neurona internuclear del NMOE registrada 14 días tras la axotomía e implante. Se observa un patrón de disparo similar al de la situación control.

El patrón de disparo de las neuronas internucleares del NMOE se vio notablemente modificado desde los 4 días tras la lesión del FLM (primer día de registro tras la sección del fascículo), mientras que las motoneuronas de este núcleo no experimentaron cambio alguno a este respecto. Las alteraciones apreciadas perduraron durante más de 2 meses (de la Cruz y col., 2000; también los presentes datos). La axotomía redujo drásticamente la frecuencia de disparo de las neuronas internucleares del NMOE (Figura 20, B), disminuyendo la modulación relacionada tanto con la posición ocular, como con la velocidad ocular (Figura 21 A y B; Figura 22, A y B; líneas y puntos rojos). Estas alteraciones condujeron a valores menores de k y de umbral durante las fijaciones en comparación con las neuronas control (Figura 21, A y B), así como a decrementos en los valores de r acompañando a los movimientos sacádicos (Figura 22, A y B). Es importante indicar que dado que la sección del FLM derecho produjo alteraciones en los movimientos oculares del ojo derecho (de la Cruz y col., 2000), todas las correlaciones entre tasa de disparo y movimientos oculares se hicieron en relación al ojo izquierdo en las 3 situaciones experimentales (control, axotomía e implante). Debido al alto grado de conjugación en los movimientos oculares horizontales en el gato, la correlación con un ojo u otro no produce cambios significativos en los parámetros neuronales (de la Cruz y col., 2000).

Se observó un resultado muy interesante al comprobar que el implante de progenitores neurales realizado en el FLM inmediatamente tras su transección, se acompañó, desde el punto de vista cualitativo, de un patrón de disparo que se asemejó, en principio, al de las neuronas control, y que discrepó claramente del presentado por las neuronas axotomizadas (Figura 20, compárese C, tras el implante, con A, control, y con B, axotomía). De hecho, las rectas de regresión obtenidas del análisis de la frecuencia de disparo frente a la posición ocular (Figura 21, A y B; líneas y puntos azules), mostraron pendientes (valores de k) parecidas a las obtenidas en las neuronas control (Figura 21, A y B; líneas y puntos negros). Igualmente la correlación entre frecuencia de disparo y velocidad ocular (Figura 22, A y B; líneas y puntos azules), también produjo rectas con pendientes (valores de r) similares a la situación control (Figura 22, A y B; líneas y puntos negros). Las variaciones en los valores de ambas sensibilidades se promediaron para su comparación a partir de poblaciones de 68 neuronas control ($n = 68$), 57 axotomizadas ($n = 57$) y 97 células registradas en gatos lesionados e implantados ($n = 97$). Los análisis estadísticos pertinentes (test de independencia; $P > 0,05$) demostraron la ausencia de recuperación espontánea en la condición de axotomía durante la totalidad del curso temporal (Figura 21, C; Figura 22, C; puntos rojos), con unos valores de sensibilidad a la posición (k) y a la velocidad (r) significativamente reducidos hasta casi la mitad de los valores de la población control (Figura 21, D; Figura 22, D), así como también disminuyó significativamente ($p < 0,05$; test de ANOVA,

método Holm-Sidak para comparaciones múltiples) el umbral de reclutamiento (Figura 23, A y B).

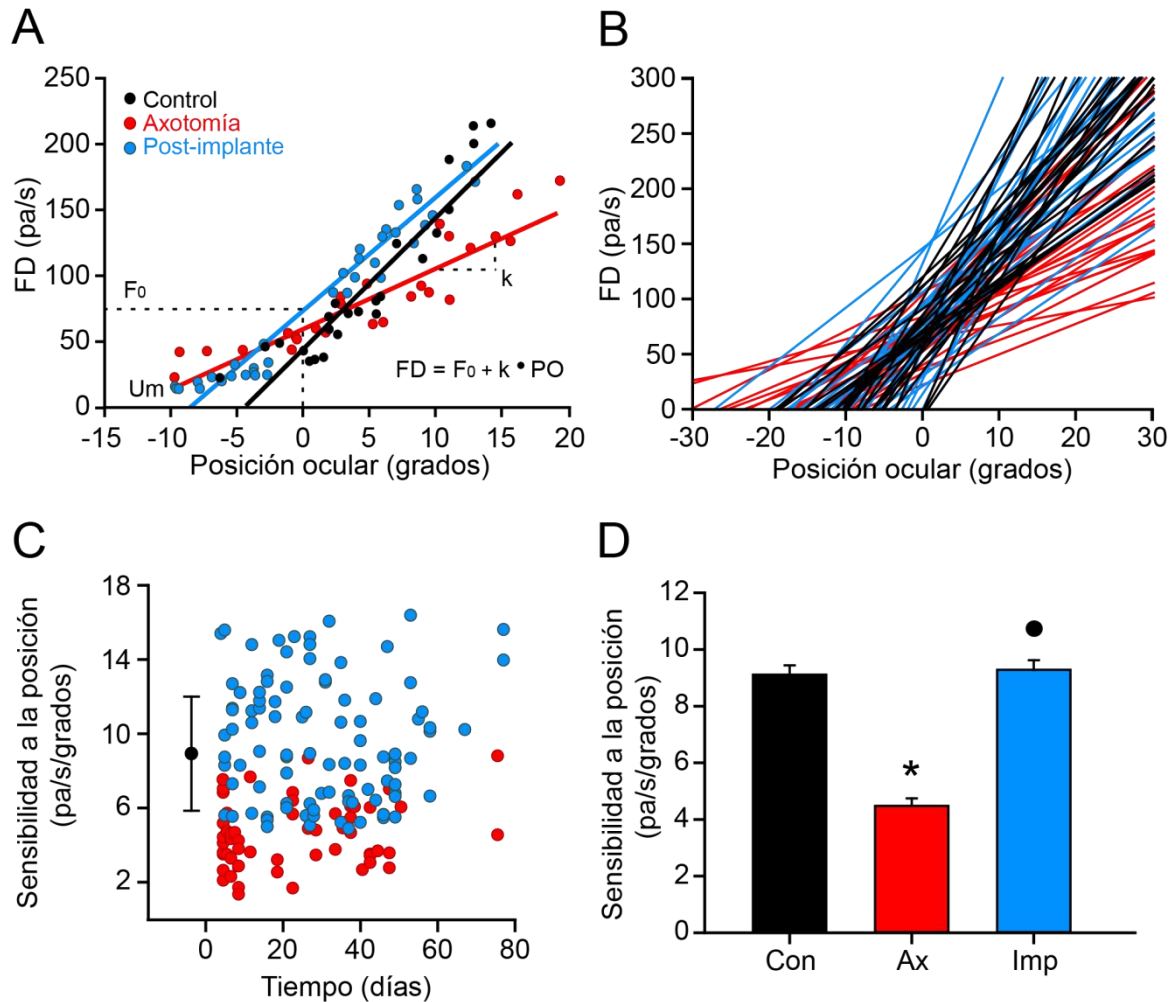


Figura 21. Análisis de la frecuencia de disparo durante fijaciones oculares. **A**, Regresión lineal entre la frecuencia de disparo (FD, en potenciales de acción/s) y la posición ocular (PO, en grados) de neuronas internucleares del NMOE registradas en las situaciones: control (negro), axotomía (14 días, rojo) y post-implante (15 días, azul). La pendiente de la recta de regresión (k) representa la sensibilidad neuronal a la posición ocular y F_0 es la frecuencia de disparo a 0 grados. También se indica el umbral de reclutamiento (U_m). **B**, Rectas de regresión frecuencia-posición que ilustran las sensibilidades a la posición ocular de 25 neuronas internucleares control (negro), 25 axotomizadas (rojo) y 25 post-implante (azul). **C**, Diagrama de dispersión de los valores de k (pa/s/grado) de las neuronas internucleares registradas, tanto axotomizadas (rojo) como tras el implante (azul), y representados frente al tiempo (días tras la lesión/implante). La media de los datos correspondientes a las neuronas control se muestra como un punto negro \pm su desviación típica. **D**, Diagrama de barras que muestra los valores promedio \pm el error estándar de la media para la sensibilidad neuronal a la posición ocular en las tres poblaciones experimentales: control (Con; $n = 68$), axotomía (Ax; $n = 57$) y post-implante (Imp; $n = 97$). Las diferencias significativas respecto al grupo control y al grupo de axotomía se muestran mediante * y ●, respectivamente ($p < 0,05$; test ANOVA, método Holm-Sidak para comparaciones múltiples).

En contraste con la axotomía, el efecto del implante de progenitores neurales mantuvo unos valores de k similares a los valores control desde el inicio al final del experimento (Figura 21, C). Al analizar el umbral de las células estudiadas, se observó el mismo efecto protector del implante (Figura 23, A). Respecto a la sensibilidad a la velocidad ocular, el efecto del implante de progenitores neurales produjo únicamente un restablecimiento parcial de este parámetro (r), siendo su valor promedio en el grupo post-implante significativamente diferente tanto al de las células control como al de las axotomizadas (Figura 22, D; asterisco y punto, respectivamente; $p < 0,05$; test de ANOVA, método Holm-Sidak para comparaciones múltiples). Es posible establecer una correlación positiva entre k y r (Delgado-García y col., 1986a), gráfico que se construyó para las tres situaciones experimentales (Figura 23, D). Dado que la k en el grupo post-implante fue similar a la del grupo control, mientras que la r fue menor, se produjo para el caso de las neuronas post-implante una recta con pendiente mayor que en la situación control (Figura 23, C; compárese línea y puntos azules, post-implante, con línea y puntos negros, control). Por tanto, para un mismo valor de k , la población de neuronas post-implante se acompañó de valores de r menores que la población control, e igualmente, para un mismo valor de r , el grupo post-implante presentó, en promedio, un valor de k mayor (Figura 23, C).

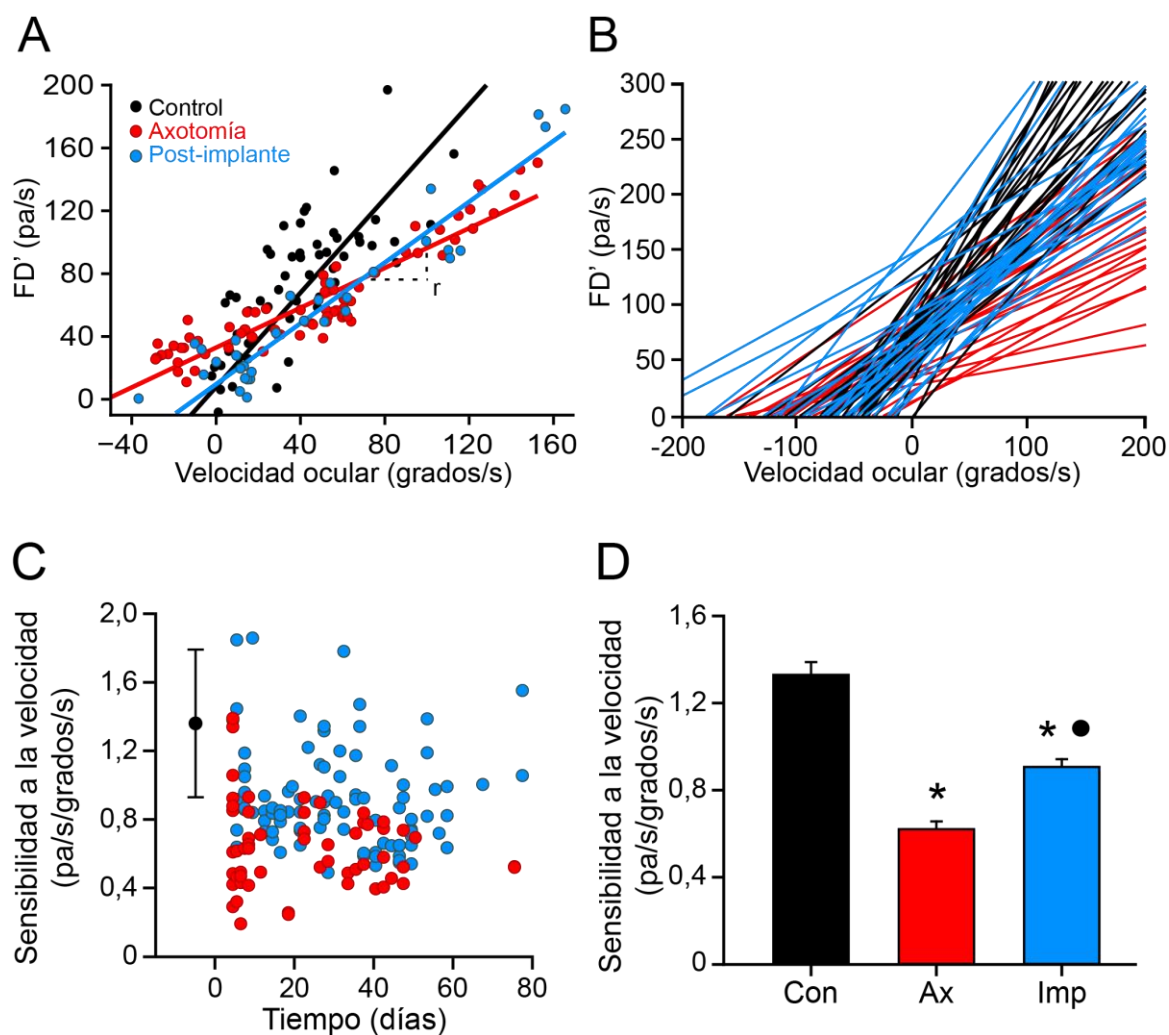


Figura 22. Análisis de la frecuencia de disparo durante movimientos sacádicos. **A**, Regresión lineal entre la frecuencia de disparo tras la sustracción del componente de posición ocular (FD', en potenciales de acción/s) y la velocidad ocular (grados/s) de neuronas internucleares del NMOE registradas en las situaciones: control (negro), axotomía (75 días, rojo) y post-implante (47 días, azul). La pendiente de la recta de regresión representa la sensibilidad neuronal a la velocidad ocular (r). **B**, Rectas de regresión frecuencia-velocidad que ilustran la sensibilidad a la velocidad ocular de 25 neuronas internucleares control (negro), 25 axotomizadas (rojo) y 25 post-implante (azul). **C**, Diagrama de dispersión de los valores de r (pa/s/grado/s) de las neuronas internucleares registradas, tanto axotomizadas (rojo) como tras el implante (azul), y representados frente al tiempo (días tras la lesión/implante). La media de los datos correspondientes a las neuronas control se muestra como un punto negro \pm su desviación típica. **D**, Diagrama de barras que muestra los valores promedio \pm el error estándar de la media para la sensibilidad neuronal a la velocidad ocular en las tres poblaciones experimentales: control (Con; $n = 68$), axotomía (Ax; $n = 57$) y post-implante (Imp; $n = 97$). Las diferencias significativas respecto al grupo control y al grupo de axotomía se muestran mediante * y ●, respectivamente ($p < 0,05$; test ANOVA, método Holm-Sidak para comparaciones múltiples).

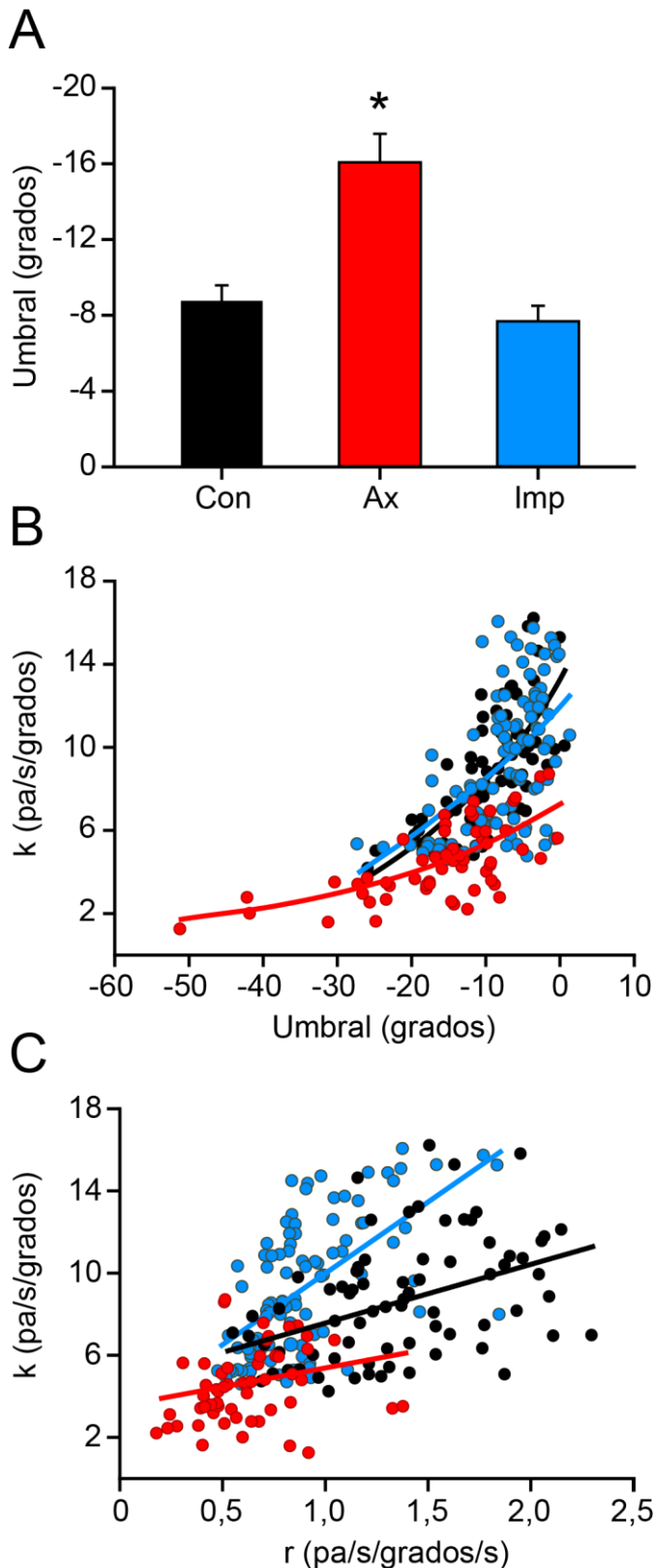


Figura 23. Reclutamiento neuronal en animales implantados. **A**, Diagrama de barras que muestra los valores promedio del umbral de reclutamiento (grados) \pm el error estándar de la media para las tres poblaciones experimentales: control (Con; $n = 68$), axotomía (Ax; $n = 57$) y post-implante (Imp; $n=97$). Las diferencias significativas respecto al grupo control se muestran mediante * ($p < 0,05$; test ANOVA, método Holm-Sidak para comparaciones múltiples). **B**, Curvas exponenciales resultantes del análisis de la sensibilidad neuronal a la posición ocular (k , en potenciales de acción/s/grados) versus el umbral de reclutamiento (grados) para las tres poblaciones experimentales: control (en negro; $y = -2,26 + 15,20 \cdot e^{0,04 \cdot x}$; $r = 0,70$), axotomía (en rojo; $y = 0,30 + 6,83 \cdot e^{-0,03 \cdot x}$; $r = 0,66$) y post-implante (en azul; $y = -7,38 + 19,26 \cdot e^{0,02 \cdot x}$; $r = 0,53$). Para todos los casos, $p < 0,001$. **C**, Regresiones lineales obtenidas del análisis de la sensibilidad a la posición ocular (k) frente a la sensibilidad a la velocidad ocular (r , en potenciales de acción/s/grados/s) para las neuronas internucleares registrada en cada una de las siguientes situaciones experimentales: control ($y = 4,67 + 2,88 x$; $r = 0,42$; $p < 0,001$); axotomía ($y = 3,33 + 1,85 x$; $r = 0,25$; $p = 0,06$) y post-implante ($y = 3,01 + 6,94 x$; $r = 0,60$; $p < 0,001$).

4.4. Alteraciones en el balance excitación-inhibición

Para determinar si el implante de progenitores neurales produjo una recuperación diferencial de las señales de disparo excitadoras respecto a las inhibitoras, se midieron de forma independiente los componentes de las sensibilidades neuronales a la posición y a la velocidad durante movimientos oculares realizados hacia la dirección *on* o hacia la dirección *off* (véanse las secciones 3.4 y 4.2). De esta manera, se obtuvieron índices separados del grado de excitación y de inhibición codificados por las neuronas internucleares del NMOE (Delgado-García y col., 1986a, b) tanto durante fijaciones oculares (parámetro *k*) como durante sacádicos (parámetro *r*). En concreto, el componente *k-on* se midió como la pendiente de la recta de regresión entre la frecuencia de disparo y aquellas fijaciones oculares que tuvieron lugar tras movimientos sacádicos en la dirección de activación (dirección *on*). Por el contrario, el procedimiento que se siguió para analizar el componente *k-off*, se basó en medidas realizadas durante fijaciones tras sacádicos *off*, tal y como se ilustra para una neurona internuclear de cada grupo experimental en la figura 24, A. Así mismo, los sacádicos se clasificaron en función de su dirección (*on/off*), obteniéndose correlaciones independientes: por un lado, la obtenida entre la frecuencia de disparo y los sacádicos *on* (la pendiente de dicha recta de regresión correspondió al parámetro *r-on*), y de otro lado, la obtenida entre frecuencia de disparo y sacádicos *off*, evitando aquellos sacádicos *off* que se acompañaron del cese en el disparo de la célula (la pendiente de esta correlación correspondió al parámetro *r-off*) (Figura 24, B; se muestra un ejemplo de *r-on* y *r-off* para tres neuronas internucleares, cada una de una situación experimental diferente).

La axotomía redujo los valores de *k-on* y *k-off* a niveles significativamente distintos del control ($p < 0,05$; test *two way* ANOVA, método Holm-Sidak para comparaciones múltiples), mientras que el implante mantuvo estos parámetros a niveles normales en comparación con el grupo control (Figura 24, C). Estos resultados respecto a los componentes excitador e inhibitor de la señal tónica (fijaciones oculares, parámetro *k*), indicaron el mantenimiento del balance sináptico *on/off* durante el disparo tónico (en la situación post-implante) en un nivel semejante al presente en la situación control. Respecto a la señal fásica (movimientos sacádicos, parámetro *r*), la axotomía condujo de nuevo a una reducción significativa respecto al control en los valores de los parámetros *r-on* y *r-off* (Figura 24, D; $p < 0,05$; test *two way* ANOVA, método Holm-Sidak para comparaciones múltiples). Sin embargo, estos dos índices se comportaron de manera diferente tras el implante de progenitores neurales. La *r-off* de los animales implantados conservó un valor similar al de las células control. No obstante, el componente *r-on* presentó un valor intermedio entre el propio de la situación control y el calculado para la axotomía (Figura 24, D; $p < 0,05$; test *two way* ANOVA, método Holm-Sidak para comparaciones múltiples). Estos

datos indicaron que mientras que la señal inhibitoria para los sacádicos *off* se restableció completamente, el impulso excitador para los sacádicos *on* sólo se preservó en parte. Estos resultados apuntan hacia un desbalance de la razón inhibición-excitación causada por un incremento de la inhibición o una pérdida de excitación en las neuronas internucleares post-implante en comparación con las células control.

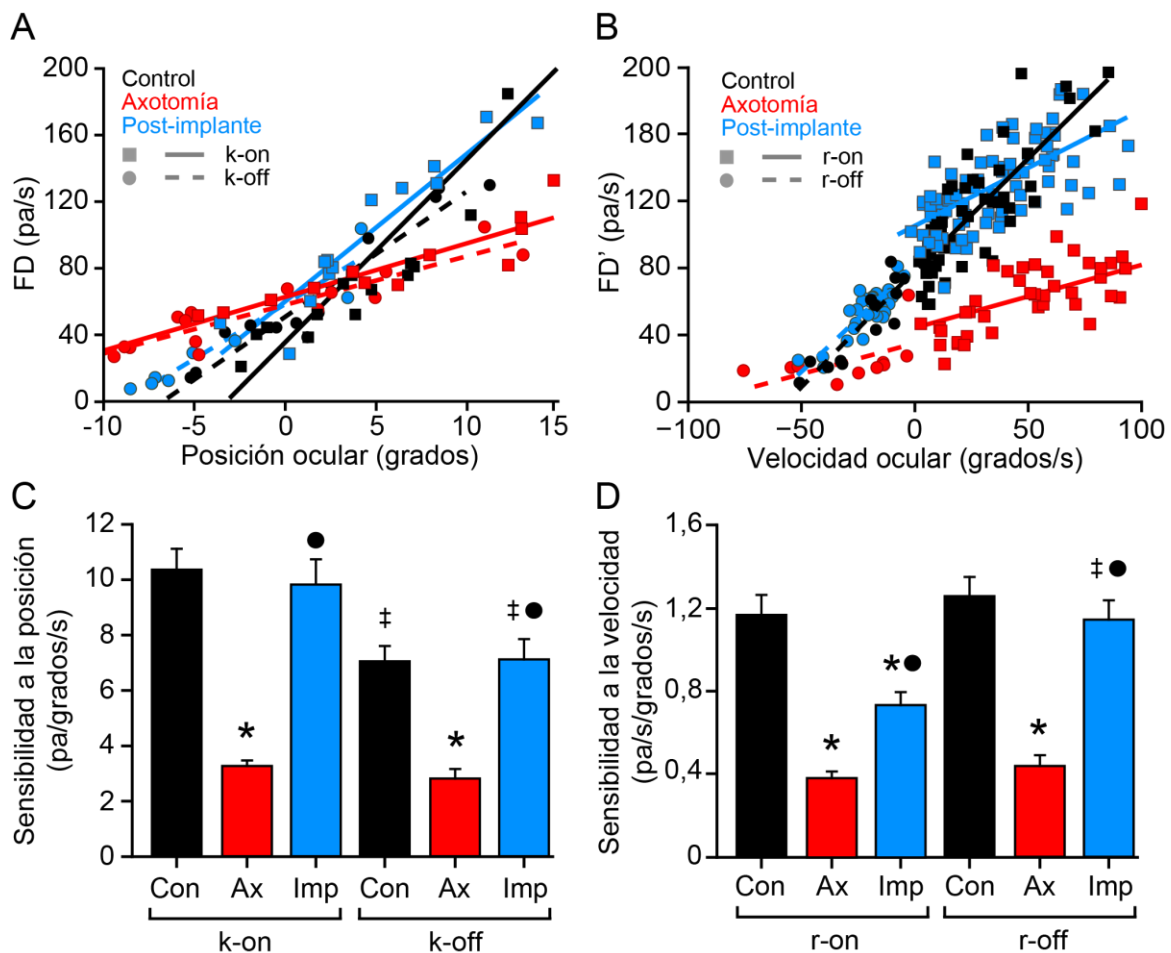


Figura 24. Análisis de las sensibilidades neuronales *on/off*. **A**, Representación de la frecuencia de disparo frente a la posición ocular separando aquellas fijaciones obtenidas tras movimientos sacádicos en la dirección *on* (cuadrados y líneas continuas; k-on, pendiente de la recta de regresión) de las subsiguientes a sacádicos en la dirección *off* (círculos y líneas discontinuas; k-off, pendiente de la recta de regresión), para una neurona internuclear control (negro), una axotomizada (rojo) y una post-implante (azul). **B**, Rectas de regresión obtenidas tras correlacionar la frecuencia de disparo (menos el componente de posición ocular, FD') con la velocidad ocular durante sacádicos en la dirección *on* (cuadrados y líneas continuas; r-on, pendiente de la recta) o en la dirección *off* (círculos y líneas discontinuas; r-off, pendiente de la recta) de una célula control (negro), una axotomizada (rojo) y una post-implante (azul). **C y D**, Diagramas de barras que muestran los valores promedio \pm el error estándar de la media para las sensibilidades neuronales *on* y *off* a la posición (**C**) y a la velocidad ocular (**D**) de 20 células de cada población experimental (control, Con; axotomía, Ax; post-implante, Imp). Las diferencias significativas respecto al grupo control y al grupo de axotomía para cada parámetro se muestran mediante * y ●, respectivamente, mientras que † simboliza las diferencias significativas entre los parámetros *on* y *off* dentro del mismo grupo ($p < 0,05$; test *two way* ANOVA, método Holm-Sidak para comparaciones múltiples).

4.5. Los implantes de progenitores neurales previenen la pérdida de aferencias sinápticas sobre las neuronas internucleares del NMOE

En busca de una correlación estructural con las alteraciones funcionales descritas en los apartados 4.2 y 4.3 de Resultados, se inició el estudio de posibles cambios en la sinaptología aferente a las neuronas internucleares del NMOE. Para ello, se analizó mediante microscopía confocal el porcentaje de perímetro somático de estas células cubierto por botones sinápticos o procesos astrocíticos, mediante tinciones inmunohistoquímicas contra sinaptofisina y GFAP, respectivamente. Así mismo, con el objetivo de determinar la razón inhibición/excitación, se midió la cobertura de botones inhibidores a través de inmunohistoquímica contra VGAT, un marcador específico de botones GABAérgicos y glicinérgicos. Todas las comparaciones entre grupos (control, axotomía y post-implante) para estas 3 inmunocitoquímicas (sinaptofisina, VGAT y GFAP) se hicieron mediante el test de ANOVA seguido por el método Holm-Sidak para comparaciones múltiples.

En la situación control, las neuronas internucleares del NMOE presentaron un $60,5 \pm 8,0\%$ del perímetro somático cubierto por botones inmunorreactivos a sinaptofisina (Figura 25, A y D; Con; $n = 46$ células), y un $7,4 \pm 4,3\%$ ocupado por procesos astrocíticos (Figura 25 I y L; Con; $n = 65$ células). El porcentaje de perímetro cubierto por botones inhibidores, es decir, por botones inmunorreactivos a VGAT, fue de $34,6 \pm 7,1\%$ en las células control (Figura 25 E y H; Con; $n = 47$ células). La axotomía redujo significativamente el porcentaje de perímetro cubierto por botones sinápticos inmunopositivos a sinaptofisina al $35,2 \pm 7,8\%$ (Figura 25, B y D; Ax; $n = 30$ células; $p < 0,05$). La cobertura somática de botones inhibidores también disminuyó significativamente en las células axotomizadas en comparación con las neuronas control (Figura 25, F y H; Ax; $n = 30$ células; $p < 0,05$). Por otro lado, los procesos astrocíticos proliferaron hasta ocupar un $12,3 \pm 7,2\%$ de la superficie celular (Figura 25, J y L; Ax; $n = 42$ células; $p < 0,05$).

El implante de células progenitoras neurales no previno completamente la reducción de botones sinápticos inmunorreactivos a sinaptofisina dispuestos sobre el soma de las neuronas internucleares axotomizadas, siendo el porcentaje obtenido de $49,4 \pm 9,1\%$ (Figura 25, C y D; Imp; $n = 51$ células), esto es, un valor intermedio entre los estados control ($60,5 \pm 8,1\%$; $n = 46$ células) y axotomía ($35,2 \pm 7,8\%$; $n = 30$ células). Sin embargo, la cobertura de VGAT se mantuvo a niveles similares al control (Figura 25, G y H; control, Con, $34,7 \pm 7,2\%$, $n = 47$ células; post-implante, Imp, $33,9 \pm 7,7\%$, $n = 35$ células), indicando que el implante previno completamente la pérdida de aferencias inhibitorias inducida por la axotomía ($23,7 \pm 6,4\%$, $n = 30$ células). Este

resultado concordó con los hallazgos neurofisiológicos descritos en detalle en el apartado 4.3 de Resultados, que mostraron la recuperación completa de la señal sacádica inhibitoria (*r-off*) pero parcial para la señal sacádica excitadora (*r-on*). El implante también previno el incremento perisomático de los procesos inmunopositivos a GFAP causado por la axotomía (Figura 25, K y L; control, Con, $n = 65$ células; axotomía, Ax, $n = 42$ células; post-implante, Imp; $n = 70$ células; $p < 0,05$ respecto a la axotomía), siendo los niveles observados ($7,2 \pm 4,3\%$) similares al control ($7,4 \pm 4,3\%$) y diferentes a los valores de axotomía ($12,3 \pm 7,3\%$).

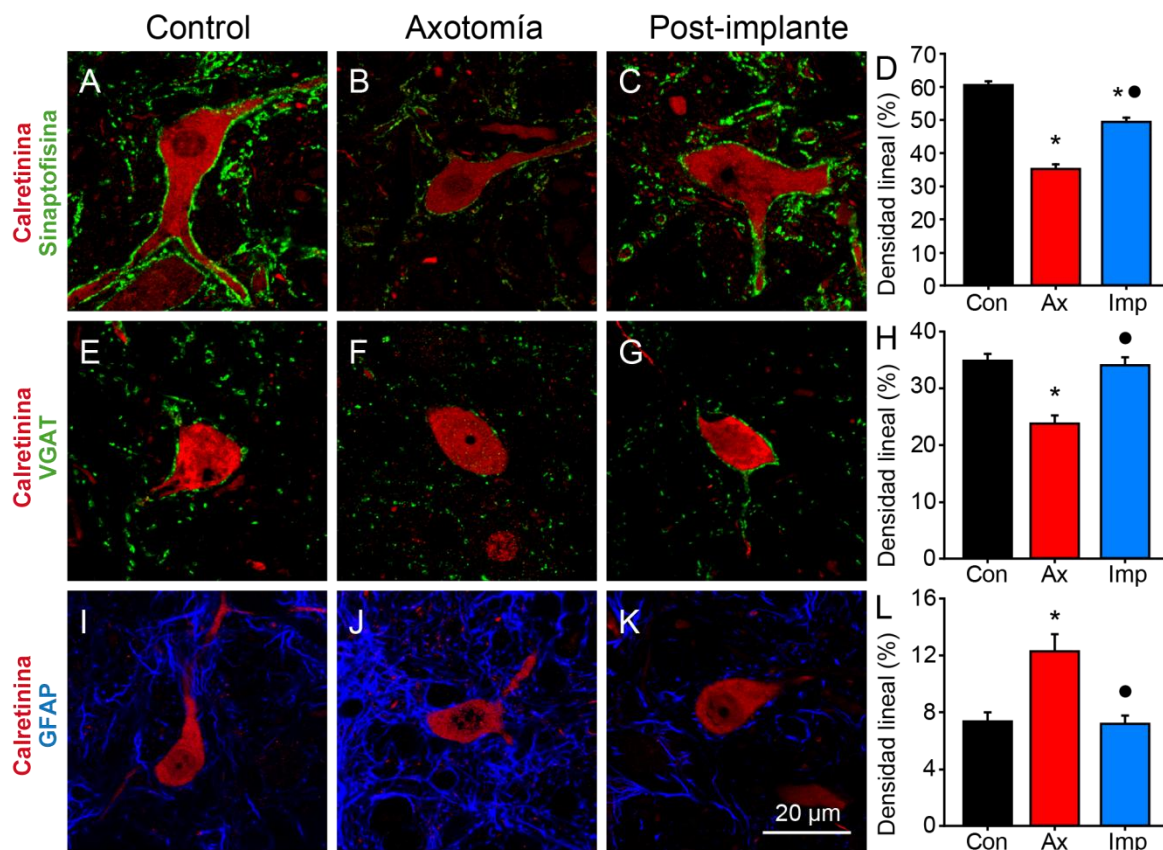


Figura 25. Efectos de la axotomía y el implante de células progenitoras neurales en la cobertura sináptica y astrocítica en el soma de las neuronas internucleares del NMOE. **A-C**, Imágenes de microscopía confocal de neuronas internucleares del NMOE (identificadas mediante su inmunorreactividad a calretinina, en rojo) y botones sinápticos (marcados mediante sinaptofisina, en verde) sobre el soma de una neurona control (**A**), una axotomizada (**B**) y otra neurona axotomizada perteneciente a un animal que recibió un implante de progenitoras neurales (**C**). **D**, Diagrama de barras en el que se muestra el porcentaje de perímetro somático cubierto por botones inmunorreactivos a sinaptofisina (densidad lineal; media \pm error estándar de la media) de neuronas internucleares del NMOE en las diferentes condiciones experimentales: control (Con; $n = 46$ células), axotomía (Ax; $n = 30$ células) y post-implante (Imp; $n = 51$ células). Las diferencias significativas respecto al grupo control y al grupo de axotomía se muestran mediante * y •, respectivamente ($p < 0,05$; test ANOVA, método Holm-Sidak para comparaciones múltiples). **E-G**, Lo mismo que en **A-C**, pero para botones inhibitorios identificados con anticuerpos contra VGAT. **H**, Diagrama de barras como en **D**, representando la densidad lineal de VGAT para 47 células control, 30 axotomizadas y 35 células post-implante. **I-K**, Igual que en **A-C**, pero para filamentos astrocíticos (identificados mediante inmunofluorescencia contra GFAP, en azul) en torno a los somas de las neuronas internucleares del NMOE. **L**, Diagrama de barras como en **D** y **H**, pero representando la densidad lineal de aposiciones inmunorreactivas a GFAP para 65 células control, 42 axotomizadas y 70 células post-implante.

En el neuropilo del NMOE, los cambios que se pudieron observar fueron similares, en general, a los mencionados para los somas neuronales. La axotomía redujo significativamente la densidad óptica de la inmunorreactividad a sinaptofisina (Figura 26, A, B y D), y a VGAT (Figura 26, E, F y H), al mismo tiempo que indujo un incremento en la reacción astrocitaria en comparación con la situación control (Figura 26, I, J y L; $p < 0,05$). La presencia de los progenitores neurales en la zona lesionada influyó en el mantenimiento de unos niveles de inmunorreactividad a GFAP similares a los medidos en la condición control (Figura 26, I, K y L). Este mismo efecto de preservación se apreció también al analizar la densidad óptica de VGAT (Figura 26, E, G y H). A diferencia de los resultados somáticos, el implante de células progenitoras mantuvo la densidad óptica de sinaptofisina a niveles similares a los medidos en la situación control (Figura 26, A C y D). Estos datos indicaron: i) que los progenitores neurales ejercieron su influencia protectora sobre la sinaptología aferente a las neuronas internucleares axotomizadas no solo sobre las entradas sinápticas somáticas, sino también sobre las dendríticas; y ii) que a nivel dendrítico los datos del análisis inmunocitoquímico mostraron una recuperación completa tanto del total de botones (inmunopositivos a sinaptofisina) como de aquellos exclusivamente inhibitorios (inmunopositivos a VGAT) y, por tanto, no se observó el desbalance a favor de la inhibición que estuvo presente en los datos perisomáticos.

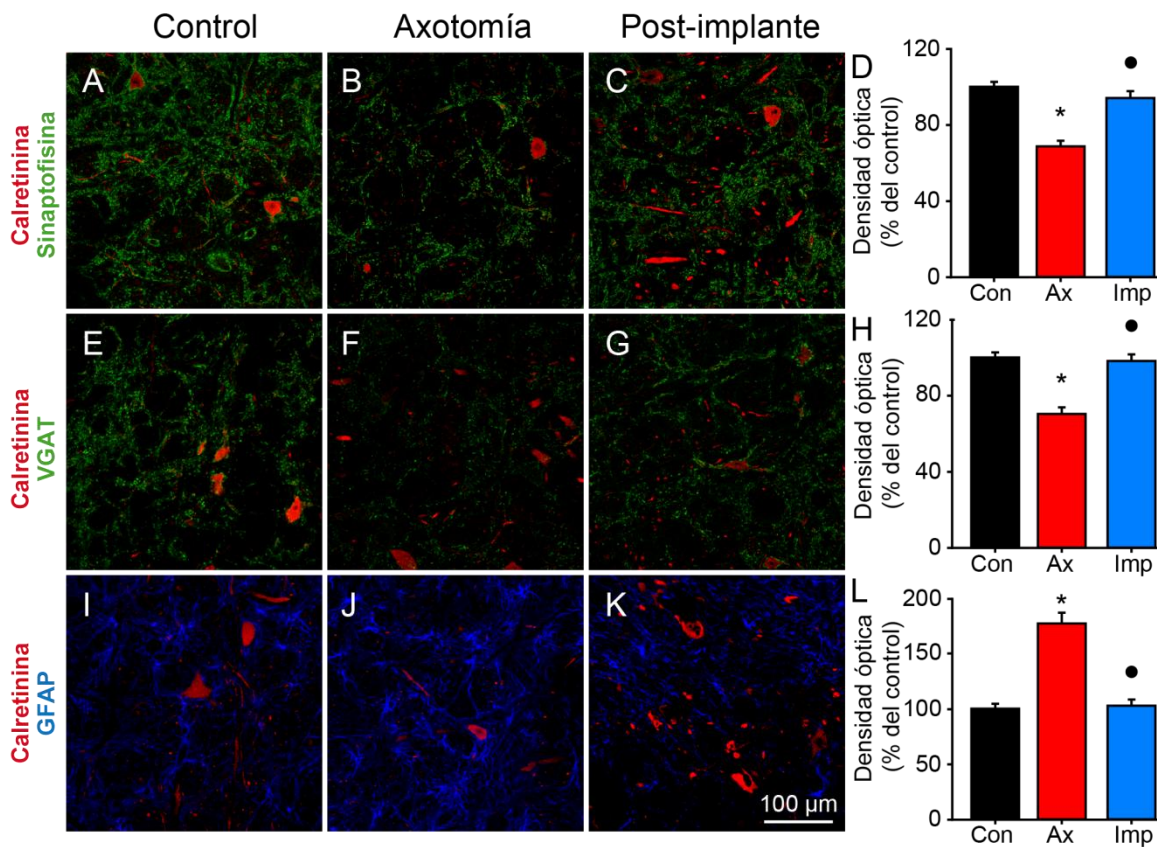


Figura 26. Efectos de la axotomía y el implante de células progenitoras neurales en la cobertura sináptica y astrocítica en el neuropilo del NMOE. **A-C,** Imágenes de microscopía confocal del NMOE tras la doble inmunofluorescencia para calretinina (neuronas internucleares, en rojo) y sinaptofisina (botones sinápticos, en verde) en las tres situaciones experimentales: control (**A**), axotomía (**B**) y post-implante (**C**). **D,** Diagrama de barras ilustrando la densidad óptica (en valor de gris promedio y expresada en porcentajes relativos al control) de botones inmunorreactivos a sinaptofisina en el neuropilo del NMOE en las tres condiciones experimentales: control (Con), axotomía (Ax) y post-implante (Imp). Los datos corresponden a la media \pm el error estándar de la media (162-330 medidas en el neuropilo). Las diferencias significativas respecto al grupo control y al grupo de axotomía se muestran mediante * y •, respectivamente ($p < 0,05$; test ANOVA, método Holm-Sidak para comparaciones múltiples). **E-G,** Lo mismo que en **A-C**, pero para botones inhibidores identificados con anticuerpos contra VGAT. **H,** Diagrama de barras como en **D**, representando la densidad óptica de botones inmunorreactivos a VGAT en el neuropilo del NMOE en las tres condiciones experimentales para 120-336 medidas. **I-K,** Igual que en **A-C**, pero para filamentos astrocíticos (identificados mediante inmunofluorescencia contra GFAP, en azul) en el neuropilo del NMOE. **L,** Diagrama de barras como en **D** y **H**, pero representando la densidad óptica de filamentos inmunorreactivos a GFAP en el neuropilo del NMOE en las tres condiciones experimentales para 198-540 medidas.

4.5. Evidencias ultraestructurales de la interacción implante-hospedador

Las células progenitoras neurales se identificaron fácilmente dentro de los límites de la lesión y sus alrededores gracias a su inmunorreactividad frente a GFP, realizada en pre-inclusión mediante revelado final con DAB y, por tanto, se visualizaron a nivel de microscopía electrónica por su marcaje electrodenso (Figura 27, A; asterisco). Con frecuencia, rodeando a cada cuerpo celular GFP-positivo, se observó un área de pequeños elementos marcados interactuando de varias maneras con otros elementos no marcados en el sitio de la lesión (Figura 27, A; flechas). Los astrocitos se identificaron por la presencia de partículas de oro sobre haces de filamentos intermedios gracias a una tinción inmunohistoquímica realizada en post-inclusión contra GFAP (Figura 27, B; flechas; véase en el inserto detalle a más aumentos de la especificidad del inmunomarcaje). También se observó habitualmente la cercana aposición entre perfiles de células implantadas GFP-positivas (marcaje electrodenso con DAB) y elementos astrocíticos GFAP-positivos identificados con oro coloidal (Figura 27, C; zona encuadrada). Aunque con menor frecuencia, también se observaron extensas aposiciones de procesos procedentes de las células implantadas con las membranas de células que podrían ser de microglía en base a su morfología (Figura 27, C y D; n indica el núcleo de posibles células microgliales cuyo fino citoplasma aparece rodeado en alta proporción por elementos marcados con DAB, procedentes de células progenitoras implantadas GFP-positivas).

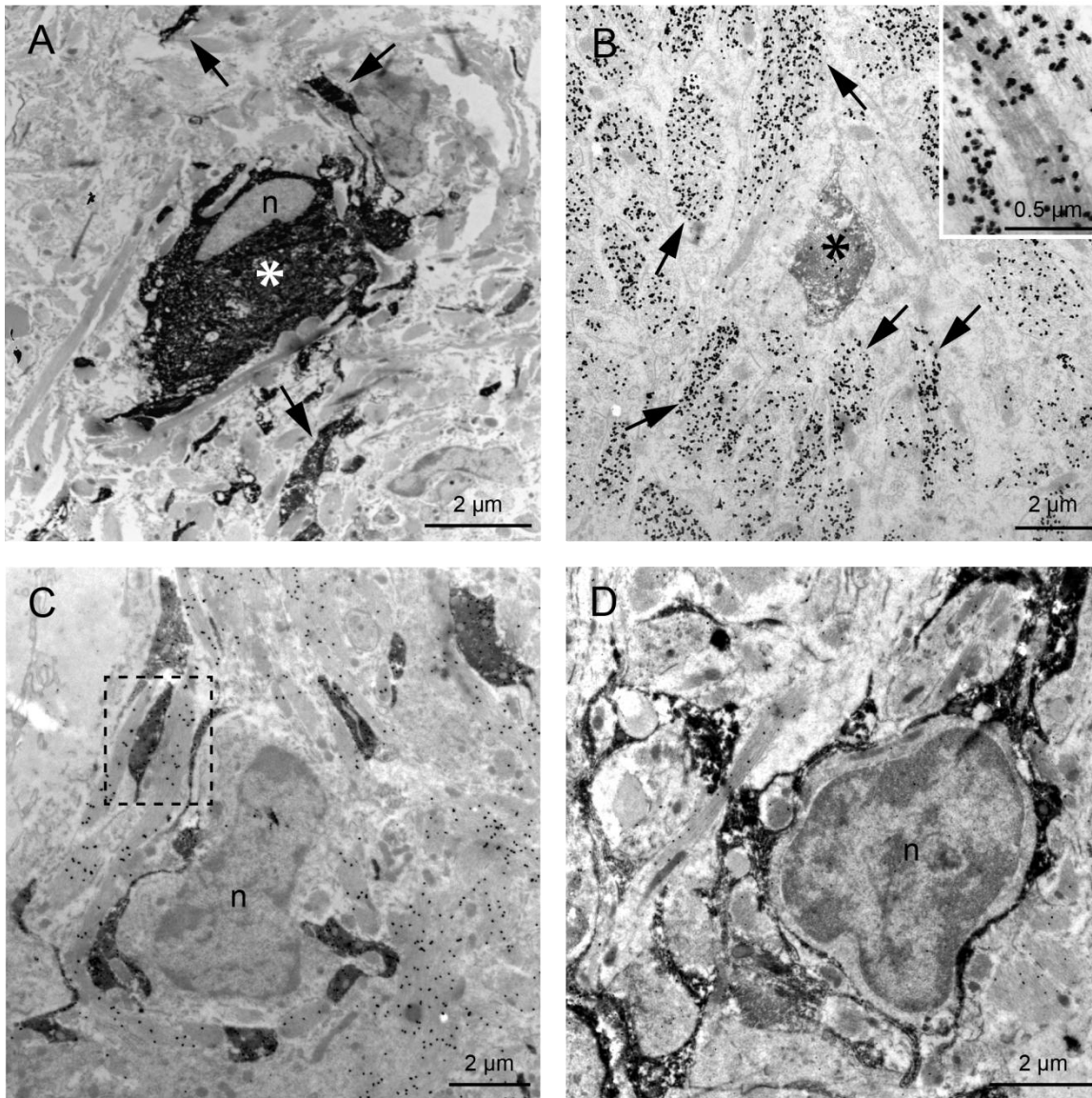


Figura 27. Relaciones de las células progenitoras neurales implantadas con el tejido hospedador a nivel ultraestructural. **A**, Soma de una célula progenitora neural inmuno-detectado con GFP (asterisco); *n* indica el núcleo de la célula. También se aprecian otros procesos identificados con GFP en el neuropilo (flechas). **B**, Un elemento inmunorreactivo a GFP derivado de una célula implantada (asterisco) rodeada de perfiles inmuno-positivos a GFAP (flechas). El inserto muestra a una mayor magnificación el inmunomarcaje con partículas de oro de los filamentos intermedios astrocíticos. **C, D**, Procesos electrodensos inmunorreactivos a GFP de células implantadas en cercana aposición a posibles células microgliales. Nótese que en las células microgliales en **C** y **D** el citoplasma es escaso y envuelve al núcleo, (*n*; **C** y **D**). El inmunomarcaje de GFAP con partículas de oro reveló la localización cercana de procesos astrocíticos hospedadores y elementos implantados (por ejemplo, la región delimitada en **C**).

En el FLM, en ningún caso se detectaron elementos axónicos en el interior de los límites de la lesión, indicativo de que los axones no cruzaron la barrera de astrocitos. Sin embargo, en la región inmediatamente caudal a la lesión, se encontraron asociaciones cercanas entre terminales axónicos y extensiones delgadas y largas de células implantadas identificadas por su señal GFP (Figura 28, A; b indica botón sináptico y el asterisco corresponde a un proceso GFP-positivo de una célula implantada). En algunos casos, se pudieron identificar densidades postsinápticas en la membrana de células implantadas (Figura 28, B; puntas de flecha). Incluso en aquellas ocasiones en las que el citoplasma oscurecido por el inmunomarcaje contra GFP impidió observar las densidades postsinápticas, se consideraron estas asociaciones terminales como indicativos de contactos sinápticos, debido a la presencia de agrupaciones de vesículas sinápticas en el elemento presináptico (Figura 28, A y B). En todos los casos, las vesículas sinápticas fueron de tipo esférico, como las observadas en los terminales de las neuronas internucleares del NMOE contactando tanto con su diana natural como con dianas anómalas (de la Cruz y col., 2002). Estos hallazgos indicaron que los axones seccionados establecieron contactos sinápticos de manera exitosa con las células implantadas. Por otro lado, también se apreciaron algunos terminales axónicos agrandados parecidos a torpedos terminales descritos previamente en neuronas internucleares axotomizadas del NMOE, carentes de elementos postsinápticos (Pastor y col., 2000). Por último, en otras ocasiones se apreciaron elementos marcados con GFP contribuyendo a la formación de unas estructuras de aspecto glomerular junto a una dendrita de una neurona hospedadora rodeada por botones sinápticos estando todo el sistema encapsulado por filamentos gliales (Figura 28, C; b indica botones sinápticos, g filamentos intermedios gliales y el asterisco corresponde a un proceso GFP-positivo de una célula implantada).

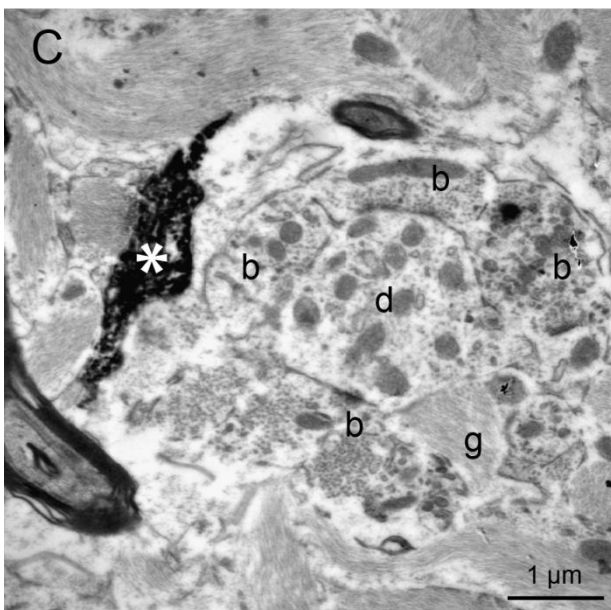
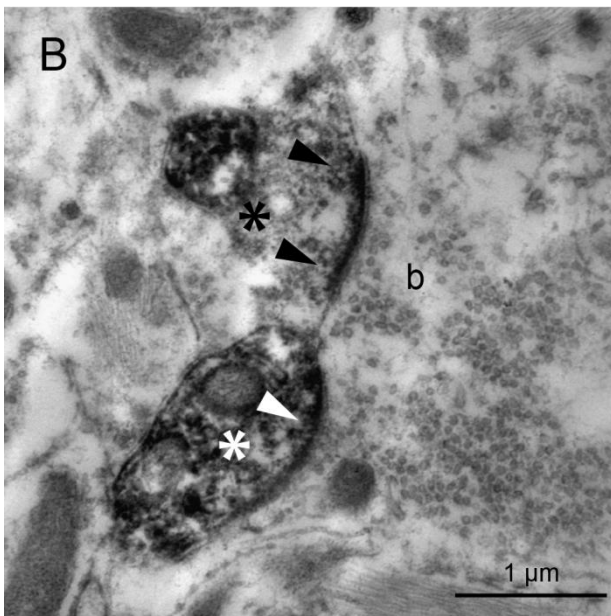
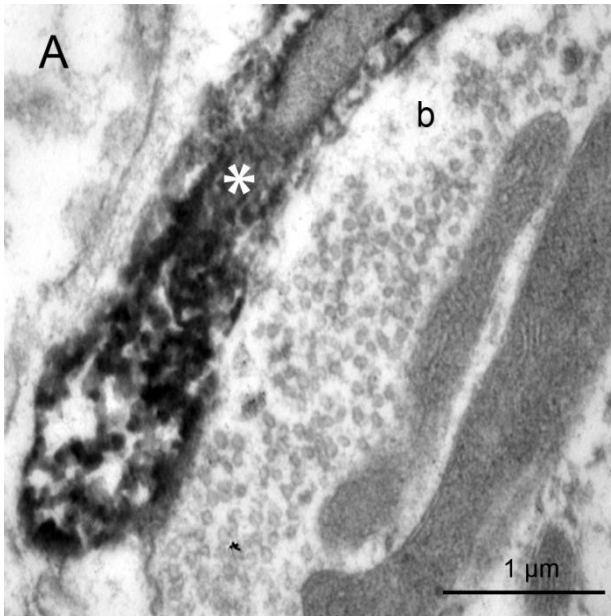


Figura 28. Conexiones sinápticas establecidas con las células progenitoras neurales implantadas en el tejido hospedador. A, B, Botones sinápticos (*b*) en contacto con perfiles inmunorreactivos a GFP (asterisco). Obsérvense las densidades postsinápticas en elementos de células progenitoras implantadas (**B**, puntas de flecha) en proximidad a agrupaciones de vesículas sinápticas en el terminal presináptico, indicativo de un contacto sináptico entre botones del hospedador y células implantadas. **C,** Elemento perteneciente a una célula implantada (inmunorreactivo a GFP; asterisco) formando parte de una estructura glomerular constituida por una dendrita (*d*) rodeada por botones sinápticos (*b*) y delimitada a su vez por filamentos intermedios gliales (*g*).

DISCUSIÓN

5. DISCUSIÓN

En este trabajo se ha mostrado cómo las células progenitoras neurales derivadas de la zona subventricular de gatos postnatales interactúan con células del hospedador tras ser implantadas en una lesión producida en el sistema nervioso central, previniendo las alteraciones en el patrón de disparo y en la conectividad sináptica inducidas por la axotomía central. Los progenitores neurales constituyen una fuente de factores tróficos y podrían actuar como una nueva diana postsináptica para las neuronas lesionadas. Por esta razón, se sugiere que los factores derivados de las células implantadas podrían jugar un papel importante en el restablecimiento, en alto grado, de las propiedades de disparo y de la conectividad sináptica de las neuronas internucleares axotomizadas del NMOE.

5.1. Aislamiento y cultivo de progenitores neurales de la zona subventricular de gatos postnatales

Las células progenitoras neurales aisladas de la zona germinal subventricular de gatos neonatales pudieron ser amplificadas *in vitro* como neuroesferas, preservando su multipotencialidad tanto *in vitro* como *in vivo*. Hasta el presente trabajo, no se conocían evidencias de la obtención de células progenitoras neurales derivadas de la zona subventricular de gatos postnatales, aunque sí existen varios trabajos previos de otros autores que han cultivado neuroesferas de este nicho neurogénico a partir de roedores en estado embrionario, postnatal y adulto (Eriksson y col., 2003; Ishii y col., 2008; Torroglosa y col., 2007), así como de embriones de gato (Wang y col., 2007). La habilidad de estas células para diferenciarse en distintas estirpes neurales (Reynolds y Weiss, 1992; Lois y Alvarez-Buylla, 1993) permite pensar en estos progenitores como una estrategia terapéutica prometedora para alcanzar una restauración funcional mediante su integración en el tejido de destino, el restablecimiento de la conectividad perdida por la lesión a través del sitio dañado (Bonner y col., 2011), y una comunicación molecular de señales entre el hospedador y el implante (Li y col., 2006; Tonchev y col., 2007). Nuestro modelo ha permitido demostrar el establecimiento de una interacción entre los axones del tejido hospedador y las células implantadas. Desafortunadamente, aún no se ha logrado en nuestro sistema el desarrollo de una estrategia que promueva el crecimiento de los axones centrales seccionados a través de la lesión y el subsiguiente restablecimiento de los contactos con su diana natural.

5.2. Integración del implante de progenitores neurales en el tejido hospedador

El implante de células realizado inmediatamente tras la lesión se ha descrito como el método apropiado para terapias basadas en el trasplante, ya que reduce el daño secundario en el tejido producido por la activación de macrófagos y promueve la recuperación (Cusimano y col., 2012). La estrategia seguida en este proyecto ha sido exactamente esta, implantando las células en el lugar de la lesión en la misma sesión quirúrgica de acuerdo a estudios previos realizados por el grupo (Pastor y col., 2000; Benítez-Temiño y col., 2005).

La mayoría de las células progenitoras implantadas permaneció en el lugar de la lesión, conformando un agregado celular extendido dorso-ventralmente siguiendo la misma trayectoria que la sección del fascículo y rodeado por una zona de reactividad glial que definió los límites de la lesión. En la zona subventricular, los progenitores neurales inician una migración hacia el bulbo olfatorio formando la corriente migratoria rostral (Lois y Alvarez-Buylla, 1994). En este camino, los neuroblastos migran en cadenas existiendo un delicado equilibrio entre señales atrayentes, repelentes y otras procedentes del tubo glial que los rodea durante el proceso, debido a la polarización y a la regulación de la maquinaria citoesquelética establecida para tal evento (Ghashghaei y col., 2007). El equilibrio que permite la migración de estas células es delicado, por lo que son pocas las estructuras permisivas a este respecto al implantar estos progenitores neurales en el sistema nervioso central adulto; por ejemplo, se ha descrito migración de estas células en tractos axonales subcorticales, como el cíngulo o el cuerpo calloso (Cayre y col., 2006). En el presente estudio, no se apreciaron evidencias claras de migración de los progenitores neurales tras su implante en el FLM.

Sin embargo, se observó que los progenitores neurales proyectaron unos procesos largos y delgados de más de 500 μm de longitud hacia los extremos caudal y rostral del FLM lesionado, zonas en las que se podrían estar recreando gradientes quimiotácticos de distintos factores. Estas prolongaciones también se han descrito en el trabajo de Cayre y col. (2006). Estos autores hallaron una gran mayoría de células unipolares y bipolares, con raras excepciones (menos de un 10%) de células implantadas con ramificaciones más complejas. En el presente estudio, algunos de los progenitores neurales, visualizados y analizados mediante microscopía confocal, se asemejaron en su morfología y en la complejidad de sus procesos a tipos gliales y neuronales. No obstante, el porcentaje de diferenciación (determinado mediante la colocalización de la señal de GFP, que identifica a las células progenitoras implantadas, junto a marcadores específicos de las diferentes estirpes neurales) resultó ser bastante bajo: i) un 10,4% de células GFP-positivas expresaron también el marcador de astrocitos GFAP, ii) un 6,0% resultó

ser inmunopositivo a doblecortina, un marcador de neuronas inmaduras, y iii) un 2,6% mostró señal inmunocitoquímica contra la proteína de precursores de oligodendrocitos NG-2. Por lo tanto, la mayoría de las células progenitoras implantadas permaneció en estado indiferenciado. Así ocurre también en otros modelos de lesión del sistema nervioso central tras el implante de progenitores neurales, ya que la respuesta inmunitaria al daño activa una reacción inflamatoria que implica el establecimiento de una comunicación entre las células del sistema inmune y los progenitores implantados, la cual los mantiene en este estado indiferenciado (Pluchino y col., 2005). Por otro lado, el fenotipo que adquieren los progenitores implantados es altamente dependiente de la procedencia del cultivo, del lugar del implante y del tipo de lesión (Cicchetti y col., 2007; Lim y col., 2007; Wang y col., 2007). No obstante, la ausencia de la adquisición de un fenotipo neural específico no resulta ser un impedimento para que estas células implantadas liberen diferentes factores tróficos (Pluchino y col., 2005) o desarrollen mecanismos inmunomoduladores con efectos neuroprotectores (Ziv y col., 2006). Estos datos resultan fundamentales en el presente trabajo, puesto que la cicatriz glial constituida en torno a la lesión (e implante) probablemente constituye un factor relevante, entre otros, que impide la reinervación de los axones seccionados para contactar con su diana original. De esta manera, las células progenitoras neurales implantadas podrían estar actuando como una fuente potencial que permite mantener el aporte trófico a las neuronas internucleares del NMOE axotomizadas.

5.3. Las células progenitoras neurales como una fuente de soporte trófico para las células lesionadas

Las células progenitoras de la zona subventricular expresan diferentes factores tróficos como NGF, BDNF, NT-3 o VEGF, tanto en su nicho neurogénico como al ser cultivadas *in vitro* (Maurer y col., 2003; Tonchev y col., 2007; también los datos presentes). Estas moléculas han resultado ser muy útiles en el restablecimiento de las alteraciones producidas por varios tipos de lesiones neuronales (Oka y col., 2004; Fagerlund y col., 2012). Las neuronas del NMOE poseen los receptores de alta afinidad para neurotrofinas trkA, trkB y trkC (Benítez-Temiño y col., 2004), por lo que podrían transportar estos factores retrógradamente desde las células implantadas. Por otro lado, se han descrito oscilaciones en los niveles de estos factores neurotróficos en diferentes modelos de lesión, relacionados directamente con la presencia de células progenitoras neurales implantadas, lo que podría ser fundamental en la recuperación de los efectos de la lesión (Imitola y col., 2004; Capone y col., 2007; Madhavan y col., 2008). Talaverón y col. (2013) realizaron, en ratas a las que se les había seccionado el FLM, implantes de progenitores neurales derivados de la zona subventricular. Empleando técnicas

inmunohistoquímicas, determinaron que en las neuronas internucleares del NMOE, la axotomía indujo un incremento significativo de la expresión de BDNF y NT-3, mientras que el implante de progenitores neurales en la zona de la lesión influyó retornando los valores de BDNF a los de la situación control y manteniendo los de NT-3 similares a los de la axotomía. Con el NGF, los datos de axotomía y los de implante se mostraron similares a los controles (Talaverón y col., 2013). Sin embargo, datos previos obtenidos en las motoneuronas del NMOE axotomizadas y tratadas con estos factores sugieren que estas neurotrofinas probablemente no estén implicadas, de forma relevante, en la mediación de los efectos beneficiosos de estos implantes sobre las neuronas internucleares del NMOE tras su axotomía. La razón de esto es que las propiedades de disparo en estas células tras realizar el implante, difirió de forma notable de las descritas en motoneuronas axotomizadas del mismo núcleo tras la administración exógena de BDNF, NT-3 o NGF (Davis-López de Carrizosa y col., 2009, 2010). Dado que en el NMOE, las motoneuronas y las neuronas internucleares poseen características de disparo similares y comparten aferencias sinápticas (Delgado-García y col., 1986a,b), es altamente probable que respondan de forma similar a las neurotrofinas. Por ejemplo, BDNF y NT-3 inducen efectos diferentes, aunque complementarios, en el disparo y la sinaptología de motoneuronas axotomizadas del NMOE. El NT-3 produce el restablecimiento del componente fásico de la tasa de disparo relacionada con los movimientos sacádicos, mientras que el BDNF restaura el disparo tónico durante las fijaciones oculares (Davis-López de Carrizosa y col., 2009). Otra neurotrofina con poderosos efectos sinaptotróficos en el sistema oculomotor es el NGF. Regula los componentes tónico y fásico del disparo (Davis-López de Carrizosa y col., 2010), pero a diferencia de los datos presentes, produce además un incremento significativo en los valores de k y r en comparación con la situación control. También se han descrito especificaciones similares de propiedades electrofisiológicas mediadas por neurotrofinas en otros sistemas (Adamson y col., 2002; Zhou y col., 2005; Salama-Cohen y col., 2006).

La respuesta fisiológica al implante de células progenitoras neurales de las neuronas internucleares del NMOE axotomizadas se caracterizó por una normalización completa de las señales inhibitorias relacionadas con los movimientos oculares, aunque manteniendo sólo de manera parcial las señales excitatorias (*r-on*). En base a estos hallazgos, se investigó la posibilidad de que las células implantadas contuviesen VEGF, puesto que este factor induce una depresión en la transmisión sináptica excitadora en diversos tipos neuronales (McCloskey y col., 2005, 2008) y, además, la expresión, tanto de esta molécula como de su receptor específico Flk-1, se da en todas las motoneuronas extraoculares, tal y como ha sido descrito en ratas adultas (Morcuende y col., 2014). En el gato, tras la lesión e implante, y mediante técnicas

inmunohistoquímicas, se pudo determinar que un 68% de las células GFP-positivas en animales implantados fueron inmunorreactivas a VEGF, al mismo tiempo que se observó la presencia del receptor de VEGF, Flk1, en todas las neuronas internucleares del NMOE, identificadas como calretina-inmunopositivas. Estos datos están en congruencia con los obtenidos por Talaverón y col. (2013), donde se observó un incremento de los niveles de VEGF en neuronas internucleares del NMOE axotomizadas de ratas implantadas con progenitores neurales. Este incremento de VEGF no tiene lugar en la situación de solo axotomía, ya que los niveles de VEGF en las neuronas internucleares controles y axotomizadas son similares, de manera que el incremento únicamente se observa tras la axotomía seguida del implante de progenitores neurales. De hecho, también en la rata se ha observado expresión de VEGF en las células implantadas (Talaverón y col., 2013), por lo que estos autores sugieren que el incremento en VEGF presente en las neuronas internucleares axotomizadas tras el implante puede proceder, al menos en parte, de las células implantadas mediante transporte retrógrado. El VEGF se describió inicialmente como un factor angiogénico, aunque estudios recientes indican que también actúa como un agente neurotrófico y neuroprotector (Storkebaum y col., 2005; Zachary, 2005; Tolosa y col., 2008; Tovar-Y-Romo y Tapia, 2010). De hecho, la aplicación de un tratamiento fundamentado en el VEGF redujo la astrogliosis y la pérdida de uniones neuromusculares en el modelo murino de esclerosis lateral amiotrófica G93A SOD1 (Sathasivam, 2008). Además, análisis de *microarray* en ratones deficientes en VEGF mostraron una regulación a la baja de genes responsables del crecimiento axonal y de la formación de sinapsis (Brockington y col., 2010).

En el presente trabajo se observaron signos ultraestructurales de interacciones entre células implantadas y del hospedador, como la disposición cercana de procesos de las células implantadas a elementos astrocíticos y microgliales, además del establecimiento de contactos sinápticos de axones del FLM sobre células progenitoras neurales. Esta íntima relación de las células progenitoras neurales implantadas con los astrocitos y células microgliales de la zona de la lesión, se ha descrito también en un artículo reciente de nuestro grupo (Talaverón y col., 2014), en el que se destaca un incremento significativo de la microglía activada asociado a la presencia del implante. Es más, en ese mismo trabajo, se demuestra mediante microscopía electrónica la existencia de uniones gap entre progenitores implantados y astrocitos o células microgliales de la zona de la lesión. Esta íntima asociación entre los progenitores implantados y las células gliales reactivas del hospedador apuntan hacia una posible mediación glial de los efectos beneficiosos del implante, ya que podría ser la base del establecimiento de un microambiente crucial en el que se liberen moléculas como factores tróficos o citoquinas

antiinflamatorias que participen en la reparación y recuperación del tejido dañado (Martino y Pluchino, 2006; Martino y col., 2011; Mathieu y col., 2010; Goldmann y Prinz, 2013).

En esta línea, los botones sinápticos que observamos en el presente trabajo entre elementos presinápticos no marcados (incluyendo, posiblemente, los cabos proximales de los axones cortados de las neuronas internucleares del NMOE) y procesos de las células implantadas identificadas por su señal GFP-DAB, constituyen otra evidencia más de la integración en el tejido hospedador, que muy probablemente contribuyó a la recuperación de los efectos derivados de la lesión. Los contactos sinápticos hospedador-implante se limitaron principalmente a la región caudal a la lesión, evidenciando que los axones de las neuronas lesionadas no atravesaron la barrera glial. En base a la ultraestructura, los botones sinápticos observados contuvieron vesículas sinápticas redondeadas y constituyeron contactos asimétricos (Peters y col., 1991), similares a los botones excitadores que forman los axones de las neuronas internucleares del NMOE sobre las motoneuronas del NMOC, su diana natural (de la Cruz y col., 2002). En nuestra situación experimental, se sugiere que se trata igualmente de botones sinápticos de naturaleza excitadora. En otros modelos de lesión, también se ha descrito el establecimiento de contactos sinápticos entre células implantadas y elementos neuronales del tejido receptor, sobre todo asociados a la diferenciación de los progenitores neurales en neuronas, tanto procedentes de la zona subventricular como del giro dentado del hipocampo (Bonner y col., 2011; Tsupykov y col., 2014). Aunque aún no se ha podido establecer la señalización que determina la diferenciación y el establecimiento de sinapsis sobre las células progenitoras neurales implantadas, sí se sabe que viene determinada por el ambiente tisular hospedador (Englund y col., 2002).

Todas estas evidencias permiten concluir que se podría establecer un soporte trófico retrógrado para las neuronas del NMOE lesionadas mediante la captación de factores liberados por las células implantadas a través de los axones seccionados. Nuestros resultados morfológicos, tanto a nivel de microscopía confocal como electrónica, muestran una disposición muy cercana entre los axones de las neuronas lesionadas y los procesos celulares de células implantadas, lo que apoya esta posibilidad (véase Figura 29, A, como diagrama resumen de las interacciones implante-hospedador en el sitio de lesión).

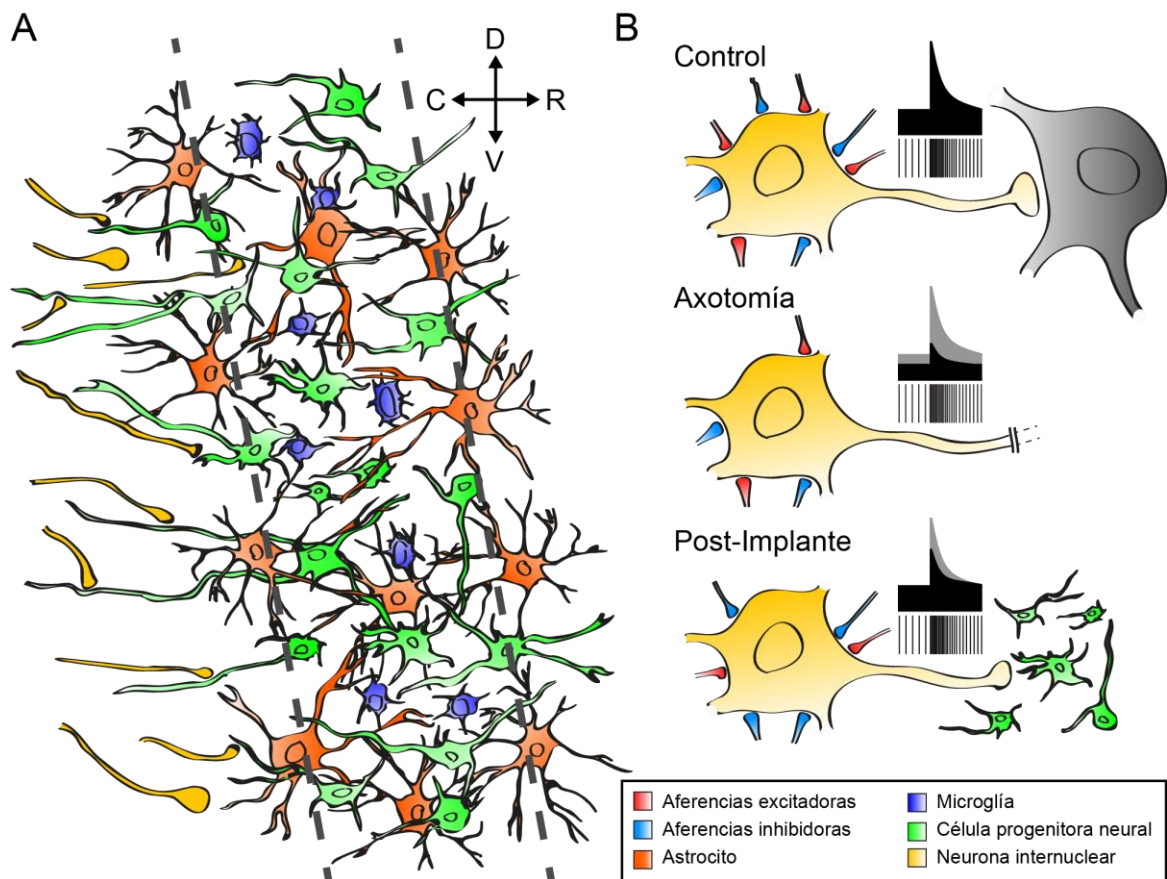


Figura 29. Resumen de las interacciones entre las células progenitoras neurales y el hospedador. A-B, Ilustración en la que se esquematizan las interacciones que se producen entre las células implantadas y el tejido hospedador (**A**), así como la respuesta fisiológica de las neuronas internucleares del NMOE (**B**). **A**, Disposición de las células implantadas (verde) interactuando con células microgliales (azul) y astrocitos (naranja). Algunos de los axones seccionados en el FLM (amarillo) establecen contactos sinápticos con procesos procedentes de células implantadas. C, Caudal; D, Dorsal; R, Rostral; V, Ventral. **B**, Ilustración de las características de disparo y de las aferencias sinápticas de las neuronas internucleares del NMOE. Las células control muestran un balance sináptico excitación/inhibición equilibrado, lo que determina su típico patrón de disparo tónico-fásico. La axotomía produce la pérdida de botones excitadores e inhibitoras en proporciones similares, resultando en un decremento de las señales tónicas y fásicas. Sin embargo, tras el implante, las neuronas internucleares del NMOE recuperan completamente las señales tónicas, mientras que el restablecimiento de las señales fásicas es parcial, paralelamente a un desbalance sináptico a favor de la inhibición.

5.4. Cambios en las aferencias excitadoras e inhibitoras a las neuronas internucleares del NMOE

La axotomía de las neuronas internucleares del NMOE tiene importantes efectos sobre su disparo, reduciendo notablemente la frecuencia de disparo y las sensibilidades a la posición y a la velocidad durante movimientos oculares espontáneos (de la Cruz y col., 2000; datos presentes). Se han postulado dos mecanismos, no excluyentes, como posibles mediadores de estas modificaciones, el primero de los cuales se basa en las alteraciones de las propiedades eléctricas de la membrana de neuronas axotomizadas, y el segundo en una disminución en la eficacia en la transmisión de las entradas sinápticas (de la Cruz y col., 1996, 2000; Pastor y col., 2000). En trabajos previos, se ha descrito detalladamente, en distintos tipos neuronales, cómo cambian ciertas propiedades de membrana como la excitabilidad, la resistencia de entrada, la corriente reobase, la electrogénesis, las características de la post-hiperpolarización y la expresión y distribución de canales iónicos ante este tipo de daño (Titmus y Faber, 1990; Ungless y col., 2002; Farkas y Povlishock, 2007). Estas modificaciones podrían afectar y, por lo tanto, alterar la actividad de disparo de las neuronas internucleares del NMOE axotomizadas. El segundo proceso responsable de los efectos fisiológicos de la axotomía es la depresión sináptica en las aferencias a estas neuronas (Pastor y col., 2000; González-Forero y col., 2003), que reduce el número de contactos entre los terminales sinápticos aferentes y la superficie de membrana post-sináptica de las neuronas axotomizadas (Delgado-García y col., 1988). De hecho, Pastor y col. (2000) describieron, mediante análisis ultraestructural, una reducción en el porcentaje del perímetro somático cubierto por botones sinápticos del 10 al 30% (entre 6 y 90 días post-lesión, respectivamente) tras la sección del axón de las neuronas internucleares del NMOE. En el presente trabajo, se encontró una reducción similar de aproximadamente un 25% (dos meses post-lesión) en la densidad lineal de botones sinaptofisina-positivos alrededor de los somas de las neuronas internucleares axotomizadas, tras el análisis a nivel de microscopía confocal. En paralelo al decremento de botones sinápticos sobre el soma de estas neuronas axotomizadas, se observó también un incremento de la cobertura somática por procesos astrocíticos GFAP-positivos, en congruencia con datos previos (Pastor y col., 2000). De hecho, se ha asociado la retirada de botones sinápticos (un proceso bastante general en neuronas axotomizadas) con el incremento de microglía reactiva así como con la hipertrofia de astrocitos, de manera que los procesos gliales parecen jugar un papel importante en la retirada de los terminales presinápticos a neuronas dañadas, interponiéndose entre el botón presináptico y la membrana postsináptica, evitando así la funcionalidad de la sinapsis (Cullheim and Thams, 2007). Nuestros datos de sinaptofisina y de GFAP analizados a nivel somático se extendieron también a los obtenidos en el neuropilo, lo que se interpreta como que la axotomía igualmente disminuye la densidad de

botones sinápticos y aumenta la reacción glial sobre las dendritas de las neuronas internucleares axotomizadas, y no exclusivamente sobre los somas. A nivel fisiológico, el decremento en la densidad de aferencias sinápticas podría ser responsable, al menos en parte, de la disminución en la frecuencia de disparo y de la caída de las sensibilidades a la posición y a la velocidad ocular ante este tipo de lesión.

Las neurotrofinas están involucradas en la restauración de diversos componentes de las propiedades de disparo de las motoneuronas axotomizadas del NMOE, ejerciendo una potente acción sinaptotrófica sobre sus aferencias (Davis-López de Carrizosa y col., 2009, 2010). Los resultados descritos en estos trabajos previos del grupo demostraron que tanto las propiedades de disparo como la cobertura sináptica de motoneuronas axotomizadas se vieron restauradas tras la administración de neurotrofinas. La intensidad de la reinervación de las entradas sinápticas retiradas tras la axotomía depende en alto grado de la disponibilidad de un nuevo tejido diana para las neuronas axotomizadas (Sumner, 1975; de la Cruz y col., 1996). Siguiendo esta línea argumental, Benítez-Temiño y col. (2002, 2003) realizaron implantes de tejido cerebeloso embrionario en gatos adultos a los que se les había seccionado el FLM, con el propósito de aportar una nueva diana a los axones lesionados. Los resultados que obtuvieron mostraron que las aferencias a las neuronas internucleares axotomizadas del NMOE se restituyen a la par que los axones seccionados superan las restricciones fisiológicas que impiden la regeneración axonal en el sistema nervioso central adulto y consiguen reinervar nuevas células diana en el primordio cerebeloso implantado. En consonancia, la frecuencia de disparo, así como las sensibilidades neuronales a la posición y a la velocidad ocular durante movimientos espontáneos se recuperan en las neuronas internucleares lesionadas tras el implante con tejido embrionario cerebeloso (Benítez-Temiño y col., 2002, 2003).

Sin embargo, los resultados obtenidos en el presente trabajo indican que, en las neuronas internucleares axotomizadas de animales implantados con células progenitoras neurales, la recuperación morfofisiológica no fue completa ya que se produjo un desbalance entre la excitación y la inhibición. En primer lugar, tuvo lugar una mejora parcial del componente *r-on* del disparo (la sensibilidad neuronal a la velocidad durante movimientos sacádicos en la dirección de activación), en contraste con la restauración completa del componente inhibitorio *r-off* (Figura 29, B; ilustración esquemática) en comparación con los respectivos datos controles (ambos parámetros, *r-on* y *r-off* disminuyeron significativamente tras la axotomía). Esto implica que la vía sináptica procedente de las neuronas reticulares de brote excitador (NBEs, del inglés *excitatory burst neurons*, responsables de la señal *r-on*) se restauró de forma parcial, mientras que las aferencias procedentes de las neuronas reticulares de brote inhibitorio (NBIs; Hikosaka y

col., 1978; Igusa y col., 1980; Büttner y Büttner-Ennever, 2006) se recuperaron por completo. El segundo de los hallazgos relevantes a este respecto fue el restablecimiento parcial de la cobertura sináptica a nivel somático, medida con inmunocitoquímica contra sinaptofisina (que marca tanto las aferencias sinápticas excitadoras como las inhibitoras), mientras que la cobertura somática de VGAT (un marcador selectivo de sinapsis inhibitoras) presentó unos valores similares a los de la situación control (Figura 29, B; aferencias sinápticas). Para interpretar estos resultados, hay que considerar que los terminales de las neuronas reticulares (NBEs e NBIs) contactan preferentemente con el soma y con las dendritas proximales de las neuronas del NMOE (Escudero y Delgado-García, 1988). Por lo tanto, la conservación de las aferencias procedentes de las NBIs podría ser la causa de la recuperación principalmente de la señal inhibitora, *r-off*, lo que explicaría el mantenimiento completo de los botones VGAT-inmunopositivos a nivel somático, pero no de la cobertura de sinaptofisina. Comparando de nuevo con los experimentos previos en este mismo modelo pero utilizando implante de tejido embrionario cerebeloso (Benítez-Temiño y col., 2002, 2003), se podría concluir que los factores liberados por el implante embrionario consiguieron rescatar todas las entradas sinápticas sobre las neuronas internucleares axotomizadas, mientras que el implante de progenitores neurales no consiguió recuperar completamente un tipo particular de entrada sináptica somática excitatoria, la procedente de las NBEs. El hecho de que distintos factores neurotróficos puedan ejercer una acción diferencial sobre distintos tipos de entradas sinápticas ha sido previamente descrito en las motoneuronas del NMOE (Davis-López de Carrizosa, 2009). Sin embargo, destaca el hecho de que en nuestros experimentos la recuperación de botones sinápticos ocurrió en paralelo a una disminución de la reacción glial hasta valores controles, tanto a nivel somático como en el neuropilo, mientras que en el implante con tejido embrionario cerebeloso la reacción glial no disminuyó completamente a nivel del neuropilo, aunque sí a nivel somático, mostrando valores intermedios entre la axotomía y el control (Benítez-Temiño y col., 2003). Por otro lado, el disparo tónico de las neuronas internucleares del NMOE se recuperó por completo tras el implante de progenitores neurales, ya que los valores de k , incluyendo $k-on$ y $k-off$, fueron similares a los medidos en células control. Esto indica que el balance excitación-inhibición de las aferencias tónicas se mantuvo similar a la situación control. Considerando que estas aferencias tónicas (originadas principalmente en el núcleo *prepositus hipoglossi*) contactan preferentemente con las dendritas distales (Escudero y Delgado-García, 1998), resulta notable que el análisis de microscopía confocal mostrase unos niveles normales de inmunorreactividad a sinaptofisina y VGAT a nivel del neuropilo del NMOE en los animales que recibieron implantes tras la lesión.

Recientemente, se ha descrito la capacidad que tienen dos moléculas tróficas de modificar el balance excitación-inhibición a favor de la inhibición, como en el presente trabajo, que son el NGF y el VEGF. Los efectos del NGF sobre este aspecto se han demostrado en neuronas del hipocampo (Salama-Cohen y col., 2006) y en motoneuronas del NMOE (Davis-López de Carrizosa y col., 2010), aunque en este último caso, se han descrito cambios adicionales. Así, los valores de k y r medidos en motoneuronas axotomizadas tras la administración de NGF fueron superiores a los apreciados en la situación control, efecto que no se ha observado en las neuronas internucleares axotomizadas del NMOE tras el implante de células progenitoras neurales. Por otro lado, el VEGF disminuye la amplitud de los potenciales post-sinápticos tras la estimulación de las vías colaterales de Schaffer en neuronas hipocampales o tras la estimulación del tracto solitario que causa respuestas excitadoras en el núcleo hipogloso (McCloskey y col., 2005, 2008). Esta depresión en la transmisión sináptica excitadora que produce el VEGF, podría ser una forma de plasticidad compensatoria dirigida a reducir la actividad en brotes espontáneos que tiene lugar en cerebros epilépticos (McCloskey y col., 2005). El VEGF actúa como un factor pleiotrópico en diferentes tipos de neuronas y células gliales, fomenta la neurogénesis y la vasculogénesis, además de ser transportado a través del axón (Storkebaum y col., 2005). Como ya ha sido discutido previamente (véase apartado 5.3), los niveles de VEGF se ven incrementados significativamente en las neuronas internucleares axotomizadas del NMOE tras realizar el implante de células progenitoras neurales (Talaverón y col., 2013), además de haberse demostrado la presencia del receptor del VEGF Flk1 en estas neuronas (Figura 19, D). Es por ello que, a pesar de que no se pueda descartar la implicación de otras moléculas neurotróficas, nuestros datos sugieren que el VEGF podría ser un factor relevante en la mediación del restablecimiento de las características de disparo de las neuronas internucleares axotomizadas del NMOE, actuando como una molécula sinaptotrófica capaz de inducir modificaciones a largo plazo en el complemento sináptico.

En conclusión, las células progenitoras neurales implantadas causan la recuperación (casi completa) de las entradas sinápticas y de las características de disparo en neuronas centrales lesionadas, devolviéndolas desde un estado alterado debido a la lesión a su modo operacional normal, lo que fomenta fuertemente el empleo de estas células como una herramienta útil para la inducción de mejoras funcionales tras un traumatismo o un desorden neurológico.

CONCLUSIONES

6. CONCLUSIONES

1. Las células progenitoras neurales derivadas de la zona subventricular de gatos postnatales expresan el ARNm para los factores tróficos NGF, NT-3 y VEGF, así como también son capaces de generar astrocitos, neuronas y progenitores de oligodendrocitos *in vitro*.

2. Las células progenitoras neurales implantadas en el fascículo longitudinal medial lesionado de gatos adultos reciben contactos sinápticos sobre su perímetro celular posiblemente procedentes de las neuronas axotomizadas.

3. Los implantes de células progenitoras neurales previenen totalmente la retracción de las sinapsis inhibitorias causada por la axotomía de las neuronas internucleares del NMOE. Sin embargo, la cobertura sináptica general se mantiene parcialmente, indicando la retirada de las aferencias excitatorias.

4. La sensibilidad neuronal a la posición ocular se mantiene en las neuronas internucleares axotomizadas del NMOE en animales implantados, aunque la sensibilidad a la velocidad ocular únicamente se preserva durante los movimientos sacádicos dirigidos hacia la dirección de inactivación, en congruencia con los resultados morfológicos.

5. El factor trófico VEGF producido por las células progenitoras neurales implantadas podría desempeñar un papel importante en la mediación del restablecimiento de las propiedades fisiológicas y morfológicas de las neuronas centrales lesionadas.

BIBLIOGRAFÍA

7. BIBLIOGRAFÍA

Adamson CL, Reid MA, Davis RL. 2002. Opposite action of brain-derived neurotrophic factor and neurotrophin-3 on firing features and ion channel composition of murine spiral ganglion neurons. *J Neurosci* 22: 1385–1396.

Aldskogius H, Liu L, Svensson M. 1999. Glial response to synaptic damage and plasticity. *J Neurosci Res* 58: 33-41.

Altman J, Das GD. 1965. Autoradiographic and histological evidence of postnatal hippocampal neurogenesis in rats. *J Comp Neurol.*, 24: 319-335.

Alvarez-Buylla A, García-Verdugo JM. 2002. Neurogenesis in adult subventricular zone. *J Neurosci* 22: 629–634.

Alvarez-Buylla A, Theelen M, Nottebohm F. 1990. Proliferation “hot spots” in adult avian ventricular zone reveal radial cell division. *Neuron* 5: 101–109.

Arévalo JC, Wu SH. 2006. Neurotrophin signaling: many exciting surprises! *Cell Mol Life Sci* 63: 1523-1537.

Azzouz M, Ralph GS, Storkebaum E, Walmsley LE, Mitrophanous KA, Kingsman SM, Carmeliet P, Mazarakis ND. 2004. *Nature* 429: 413-417.

Baker R, Delgado-García JM, McCrea R. 1981. Morphological and physiological effects of axotomy on cat abducens motoneurons. In: *Lesion induced neuronal plasticity in sensorimotor systems* (Flohr H, Precht W, eds), pp 51–63. Berlin: Springer.

Baker R, Precht W. 1972. Electrophysiological properties of trochlear motoneurons as revealed by IVth nerve stimulation. *Exp Brain Res* 14: 127-157.

Baker RG, Mano N, Shimazu H. 1969. Postsynaptic potentials in abducens motoneurons induced by vestibular stimulation. *Brain Res* 15(2): 577-80.

Barmack NH. 1974. Saccadic discharges evoked by intracellular stimulation of extraocular motoneurons. *J Neurophysiol* 37: 395–412.

Bath KG, Lee FS. 2010. Neurotrophic factor control of adult SVZ neurogenesis. *Dev Neurobiol* 70: 339-49.

Bayliss DA, Viana F, Bellingham MC, Berger AJ. 1994. Characteristics and postnatal development of a hyperpolarization activated inward current in rat hypoglossal motoneurons *in vitro*. *J Neurophysiol* 71: 119–128.

Bean BP. 2007. The action potential in mammalian central neurons. *Nat Rev Neurosci* 8: 541-465.

Becker W. 1989. The neurobiology of saccadic eye movements. *Metrics. Rev Oculomot Res* 3: 13-67.

- Belton T, McCrea RA. 2000. Role of the cerebellar flocculus region in cancellation of the VOR during passive whole body rotation. *J Neurophysiol* 84(3): 1599-1613.
- Benítez-Temiño B, de la Cruz RR, Pastor AM. 2002. Firing properties of axotomized central nervous system neurons recover after graft reinnervation. *J Comp Neurol* 444(4): 324-344.
- Benítez-Temiño B, de la Cruz RR, Pastor AM. 2003. Grafting of a new target prevents synapse loss in abducens internuclear neurons induced by axotomy. *Neuroscience* 118(3): 611-626.
- Benítez-Temiño B, Morcuende S, Mentis GZ, de la Cruz RR, Pastor AM. 2004. Expression of Trk receptors in the oculomotor system of the adult cat. *J Comp Neurol* 473: 538–552.
- Benítez-Temiño B, de la Cruz RR, Tena JJ, Pastor AM. 2005. Cerebellar grafting in the oculomotor system as a model to study target influence on adult neurons. *Brain Res Brain Res Rev* 49: 317–329.
- Bhattacharjee A, Gan L, Kaczmarek LK. 2002. Localization of the Slack potassium channel in the rat central nervous system. *J Comp Neurol* 454(3): 241-254.
- Bhidayasiri R, Plant GT, Leigh RJ. 2000. A hypothetical scheme for the brainstem control of vertical gaze. *Neurology* 54(10): 1985-1993.
- Blanks RH, Estes MS, Markham CH. 1975. Physiologic characteristics of vestibular first-order canal neurons in the adult cat. II. Response to constant angular acceleration. *J Neurophysiol* 38: 1250-1268.
- Bonner JF, Connors TM, Silverman WF, Kowalski DP, Lemay MA, Fischer I. 2011. Grafted neural progenitors integrate and restore synaptic connectivity across the injured spinal cord. *J Neurosci* 31: 4675– 4686.
- Boyce VS, Park J, Gage FH, Mendell LM. 2012. Differential effects of brain-derived neurotrophic factor and neurotrophin-3 on hindlimb function in paraplegic rats. *Eur J Neurosci* 35: 221–232.
- Bozoyan L, Khilghatyan J, Saghatelian A. 2012. Astrocytes control the development of the migration-promoting vasculature scaffold in the postnatal brain via VEGF signaling. *J Neurosci* 32: 1687–1704.
- Brännström T, Havton L, Kellerth JO. 1992. Restorative effects of reinnervation on the size and dendritic arborization patterns of axotomized cat spinal alpha-motoneurons. *J Comp Neurol* 318: 452-461.
- Bras H, Cogan P, Tyc-Dumont S. 1987. The dendrites of single brain-stem motoneurons intracellularly labelled with horseradish peroxidase in the cat. Morphological and electrical differences. *Neuroscience* 22: 947-970.
- Brockington A, Heath PR, Holden H, Kasher P, Bender FL, Claes F, Lambrechts D, Sendtner M, Carmeliet P, Shaw PJ. 2010. Downregulation of genes with a function in axon outgrowth and synapse formation in motor neurones of the VEGFdelta/delta mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. *BMC Genomics* 11: 203.

Broussard DM, DeCharms RC, Lisberger SG. 1995. Inputs from the ipsilateral and contralateral vestibular apparatus to behaviorally characterized abducens neurons in rhesus monkeys. *J Neurophysiol* 74(6): 2445-2459.

Büttner-Ennever JA. 2006. The extraocular motor nuclei: organization and functional neuroanatomy. *Prog Brain Res* 151: 95-125.

Büttner-Ennever JA, Akert K. 1981. Medial rectus subgroups of the oculomotor nucleus and their abducens internuclear input in the monkey. *J Comp Neurol* 197(1): 17-27.

Büttner U, Büttner-Ennever JA. 2006. Present concepts of oculomotor organization. In: *Neuroanatomy of the oculomotor system* (Büttner- Ennever JA, ed.), pp 1–42.

Büttner-Ennever JA, Henn V. 1976. An autoradiographic study of the pathways from the pontine reticular formation involved in horizontal eye movements. *Brain Res* 108: 155-164.

Calvo CF, Fontaine RH, Soueid J, Tammela T, Makinen T, Alfaro-Cervello C, Bonnaud F, Miguez A, Benhalm L, Xu Y, Barallobre MJ, Moutkine I, Lyytikä J, Tatlisumak T, Pytowski B, Zaic B, Richardson W, Kessar N, García-Verdugo JM, Alitalo K, Eichmann A, Thomas JL. 2011. Vascular endothelial growth factor receptor 3 directly regulates murine neurogenesis. *Genes Dev* 25: 831-844.

Cannon SC, Robinson DA. 1987. Loss of the neural integrator of the oculomotor system from brain stem lesion on monkey. *J Neurophysiol* 57: 1383-1409.

Capone C, Frigerio S, Fumagalli S, Gelati M, Principato MC, Storini C, Montinaro M, Kraftsik R, De Curtis M, Parati E, De Simoni MG. 2007. Neurosphere-derived cells exert a neuroprotective action by changing the ischemic microenvironment. *PLoS One* 2: e373.

Carpenter MB, Periera AB, Guha N. 1992. Immunocytochemistry of oculomotor afferents in the squirrel monkey (*Saimiri sciureus*). *J Hirnforsch* 33: 151–167.

Carrascal L, Nieto-González JL, Cameron WE, Torres B, Núñez-Abades P. 2005. Changes during the postnatal development in physiological and anatomical characteristics of rat motoneurons studied *in vitro*. *Brain Res Rev* 49: 377-387.

Carrascal L, Nieto-González JL, Núñez-Abades P, Torres B. 2006. Temporal sequence of changes in electrophysiological properties of oculomotor motoneurons during postnatal development. *Neuroscience* 140: 1223-1237.

Cayre M, Bancila M, Virad I, Borges A, Durbec P. 2006. Migrating and myelinating potential of subventricular zone neural progenitor cells in white matter tracts of the adult rodent brain. *Mol Cell Neurosci* 31(4): 748-758.

Chao MV. 2003. Neurotrophins and their receptors: a convergence point for many pathways. *Nat Rev Neurosci* 4: 299 –309.

Chen-Huan C, McCrea RA. 1998. Viewing distance related sensory processing in the ascending tract of Deiters vestibule-ocular reflex pathway. *J Vest Res* 8: 175-184.

Chubb MC, Fuchs AF. 1982. Contribution of γ group of vestibular nuclei and dentate nucleus of cerebellum to generation of vertical smooth eye movements. *J Neurophysiol* 48(1): 75-99.

Cicchetti F, Gross RE, Bulte JW, Owen M, Chen I, Saint-Pierre M, Wang X, Yu M, Brownell AL. 2007. Dual-modality in vivo monitoring of subventricular zone stem cell migration and metabolism. *Contrast Media Mol Imaging* 2(3): 130-138.

Conn G, Bayne ML, Soderman DD, Kwok PW, Sullivan KA, Palisi TM, Hope DA, Thomas KA. 1990. Amino acid and cDNA sequences of a vascular endothelial cell mitogen that is homologous to platelet-derived growth factor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 87: 2628–2632.

Cooper-Kuhn CM, Kuhn HG. 2002. Is it all DNA repair? Methodological considerations for detecting neurogenesis in the adult brain. *Brain Res Brain Res* 134 (1-2):13-21.

Crawford AC, Evans MG, Fettiplace R. 1991. The actions of calcium on the mechano-electrical transducer current of turtle hair cells. *J Physiol* 434: 369-398.

Crouch EE, Liu C, Silva-Vargas V, Doetsch F. 2015. Regional and stage-specific effects of prospectively purified vascular cells on the adult V-SVZ neural stem cell lineage. *J Neurosci* 35: 4528–4539.

Cullheim S, Thams S. 2007. The microglial networks of the brain and their role in neuronal network plasticity after lesion. *Brain Res Rev* 55: 89-96.

Cummings BJ, Uchida N, Tamaki SJ, Salazar DL, Hooshmand M, Summers R, Gage FH, Anderson AJ. 2005. Human neural stem cells differentiate and promote locomotor recovery in spinal cord-injured mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102: 14069–14074.

Cusimano M, Biziato D, Brambilla E, Donegà M, Alfaro-Cervello C, Snider S, Salani G, Pucci F, Comi G, García-Verdugo JM, De Palma M, Martino G, Pluchino S. 2012. Transplanted neural stem/precursor cells instruct phagocytes and reduce secondary tissue damage in the injured spinal cord. *Brain* 135: 447– 460.

Danscher G, Zimmer J. 1978. An improved Timm-sulphide method for light and electron microscopic localization of heavy metals in biological tissues. *Histochemistry* 55: 27– 40.

Davies AM, Thoenen H, Barde YA. 1986. The response of chick sensory neurons to brain-derived neurotrophic factor. *J Neurosci* 6: 1897-1904.

Davis-López de Carrizosa MA, Tena JJ, Benítez-Temiño B, Morado-Díaz CJ, Pastor AM, de la Cruz RR. 2008. A chronically implantable device for the controlled delivery of substances, and stimulation and recording of activity in severed nerves. *J Neurosci Methods* 167: 302–309.

Davis-López de Carrizosa MA, Morado-Díaz CJ, Tena JJ, Benítez-Temiño B, Pecero ML, Morcuende SR, de la Cruz RR, Pastor AM. 2009. Complementary actions of BDNF and neurotrophin-3 on the firing patterns and synaptic composition of motoneurons. *J Neurosci* 29: 575–587.

Davis-López de Carrizosa MA, Morado-Díaz CJ, Morcuende S, de la Cruz RR, Pastor AM. 2010. Nerve growth factor regulates the firing patterns and synaptic composition of motoneurons. *J Neurosci* 30: 8308–8319.

Davis-López de Carrizosa MA, Morado-Díaz CJ, Miller JM, de la Cruz RR, Pastor AM. 2011. Dual encoding of muscle tension and eye position by abducens motoneurons. *J Neurosci* 31: 2271–2279.

de la Cruz RR, Pastor AM, Martínez-Guijarro FJ, López-García C, Delgado-García JM. 1992. Role of GABA in the extraocular motor nuclei of the cat: a postembedding immunocytochemical study. *Neuroscience* 51: 911–929.

de la Cruz RR, Pastor AM, Delgado-García JM. 1994. Effects of target depletion on adult mammalian central neurons: morphological correlates. *Neuroscience* 58(1): 59-79.

de la Cruz RR, Pastor AM, Delgado-García JM. 1996. Influence of the postsynaptic target on the functional properties of neurons in the adult mammalian central nervous system. *Rev Neurosci* 7: 115–149.

de la Cruz RR, Pastor AM, Martínez-Guijarro FJ, López-García C, Delgado-García JM. 1998. Localization of parvalbumin, calretinin, and calbindin D-28k in identified extraocular motoneurons and internuclear neurons of the cat. *J Comp Neurol* 390: 377–391.

de la Cruz RR, Delgado-García JM, Pastor AM. 2000. Discharge characteristics of axotomized abducens internuclear neurons in the adult cat. *J Comp Neurol* 427: 391–404.

de la Cruz RR, Benítez-Temiño B, Pastor AM. 2002. Intrinsic determinants of synaptic phenotype: an experimental study of abducens internuclear neurons connecting with anomalous targets. *Neuroscience* 112: 759–771.

Dean P. 1997. Simulated recruitment of medial rectus motoneurons by abducens internuclear neurons: synaptic specificity vs. intrinsic motoneuron properties. *J Neurophysiol* 78: 1531–1549.

Dechant G, Rodríguez-Tébar A, Kolbeck R, Barde YA. 1993. Specific high-affinity receptors for neurotrophin-3 on sympathetic neurons. *J Neurosci* 13: 2610-2616.

Delgado-García JM, del Pozo F, Baker R. 1986a. Behavior of neurons in the abducens nucleus of the alert cat-I. Motoneurons. *Neuroscience* 17: 929–952.

Delgado-García JM, del Pozo F, Baker R. 1986b. Behavior of neurons in the abducens nucleus of the alert cat-II. Internuclear neurons. *Neuroscience* 17: 953–973.

Delgado-García JM, del Pozo F, Spencer RF, Baker R. 1988. Behavior of neurons in the abducens nucleus of the alert cat. III. Axotomized motoneurons. *Neuroscience* 24: 143-160.

Delgado-García JM, Vidal PP, Gómez C, Berthoz A. 1989. A neurophysiological study of prepositus hypoglossi neurons projecting to oculomotor and preoculomotor nuclei in the alert cat. *J Neurosci* 9(2): 291-307.

Derouiche A, Aniauf E, Aumann G, Mühistädt B, Lavialle M. 2002. Anatomical aspects of glial-synapse interaction: the presynaptic glial sheath consists of a specialized astrocyte compartment. *J Physiol Paris* 96: 177-182.

- Destombes J, Rouvière A. 1981. Ultrastructural study of vestibular and reticular projections to the abducens nucleus. *Exp Brain Res* 43(3-4): 253-260.
- Dimou L, Götz M. 2014. Glial cells as progenitors and stem cells: New Roles in the Healthy and Diseased Brain. *Physiol Rev* 94: 709–737.
- Doetsch F, Alvarez-Buylla A. 1996. Network of tangential pathways for neuronal migration in adult mammalian brain. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93: 14895–14900.
- Doetsch F, Caillé I, Lim D a, García-Verdugo JM, Alvarez-Buylla A. 1999. Subventricular zone astrocytes are neural stem cells in the adult mammalian brain. *Cell* 97: 703–16.
- Doetsch F, García-Verdugo JM, Alvarez-Buylla A. 1997. Cellular composition and threedimensional organization of the subventricular germinal zone in the adult mammalian brain. *J Neurosci* 17: 5046–5061.
- Doetsch F, Petreanu L, Caille I, Garcia-Verdugo JM, Alvarez-Buylla A. 2002. EGF converts transit-amplifying neurogenic precursors in the adult brain into multipotent stem cells. *Neuron* 36: 1021–1034.
- Donaghy M. 1980. The cat's vestibulo-ocular reflex. *J Physiol* 300: 337-351.
- Durand J. 1989a. Electrophysiological and morphological properties of rat abducens motoneurons. *Exp Brain Res* 76: 141–152.
- Durand J. 1989b. Intracellular study of oculomotor neurons in the rat. *Neuroscience* 30: 639–649.
- Emirandetti A, Grazielle Zanon R, Sabha M Jr, de Oliveira AL. 2006. Astrocyte reactivity influences the number of presynaptic terminals apposed to spinal motoneurons after axotomy. *Brain Res* 1095: 35-42.
- Englund U, Bjorklund A, Wictorin K, Lindvall O, Kokaia M. 2002. Grafted neural stem cells develop into functional pyramidal neurons and integrate into host cortical circuitry. *Proc Natl Acad Sci USA* 99(26): 17089-17094.
- Eriksson C, Björklund A, Wictorin K. 2003. Neuronal differentiation following transplantation of expanded mouse neurosphere cultures derived from embryonic forebrain regions. *Exp Neurol* 184(2): 615-635.
- Eriksson PS, Perfilieva E, Björk-Eriksson T, Alborn A M, Nordborg C, Peterson D A, Gage FH. 1998. Neurogenesis in the adult human hippocampus. *Nat Med* 4: 1313–1317.
- Ernfors P, Ibáñez CF, Ebendal T, Olson L, Persson H. 1990. Molecular cloning and neurotrophic activities of a protein with structural similarities to nerve growth factor: developmental and topographical expression in the brain. *Proc Natl Acad Sci U S A* 87: 5454 –5458.
- Ernfors P, Lee KF, Kucera J, Jaenisch R. 1994. Lack of neurotrophin-3 leads to deficiencies in the peripheral nervous system and loss of limb proprioceptive afferents. *Cell* 77: 503-512.

Escudero M, de la Cruz RR. 1989. Activity of premotor vestibular neurons in the alert cat. *Rev Esp Fisiol* 45(2): 171-178.

Escudero M, de la Cruz RR, Delgado-García JM. 1992. A physiological study of vestibular and prepositus hypoglossi neurones projecting to the abducens nucleus in the alert cat. *J Physiol* 458: 539-560.

Escudero M, Delgado-García JM. 1988. Behavior of reticular, vestibular and prepositus neurons terminating in the abducens nucleus of the alert cat. *Exp Brain Res* 71: 218–222.

Evarts EV. 1966. Pyramidal tract activity associated with a conditioned hand movement in the monkey. *J Neurophysiol* 29: 1011-1027.

Evinger C. 1988. Extraocular motor nuclei: localization, morphology and afferents. *Rev Oculomot Res* 2: 81-117.

Fagerlund M, Pérez Estrada C, Jaff N, SvenssonMBrundin L. 2012. Neural stem/progenitor cells transplanted to the hypoglossal nucleus integrates with the host CNS in adult rats and promotes motor neuron survival. *Cell Transplant* 21: 739–747.

Falkenberg T, Mohammed AK, Henriksson B, Persson H, Winblad B, Lindefors N. 1992. Increased expression of brain-derived neurotrophic factor mRNA in rat hippocampus is associated with improved spatial memory and enriched environment. *Neurosci Lett* 138: 153-156.

Farkas O, Povlishock JT. 2007. Cellular and subcellular change evoked by diffuse traumatic brain injury: a complex web of change extending far beyond focal damage. *Prog Brain Res* 161: 43-59.

Ferrara N, Gerber H-P, LeCouter J. 2003. The biology of VEGF and its receptors. *Nat Med* 9:669–676.

Ferrara N, Henzel WJ. 2012. Pituitary follicular cells secrete a novel heparin-binding growth factor specific for vascular endothelial cells. 1989. *Biochem Biophys Res Commun* 425: 540–7.

Fu SY, Gordon T. 1997. The cellular and molecular basis of peripheral nerve regeneration. *Mol Neurobiol* 14: 67–116.

Fuchs AF, Luschei ES. 1970. Firing patterns of abducens neurons of alert monkeys in relationship to horizontal eye movement. *J Neurophysiol* 33: 382-392.

Fuchs AF, Robinson DA. 1966. A method for measuring horizontal and vertical eye movement chronically in the monkey. *J Appl Physiol* 21: 1068–1070.

Fuchs AF, Scudder CA, Kaneko CR. 1988. Discharger pattern and recruitment order of identified motoneurons and internuclear neurons in the monkey abducens nucleus. 60(6): 1874-1895.

Fukushima K, Fukushima J, Kaneko CR, Fuchs AF. 1999. Vertical Purkinje cells of the monkey floccular lobe: simple-spike activity during pursuit and passive whole body rotation. *J Neurophysiol* 82(2): 787-803.

Fukushima K, Kaneko CR. 1995. Vestibular integrators in the oculomotor system. *Neurosci Res* 22(3): 249-58.

Fukushima K, Kaneko CR, Fuchs AF. 1992. The neuronal substrate of integration in the oculomotor system. *Prog Neurobiol* 39: 609-639.

Gamlin PD, Yoon K, Zhang H. 1996. The role of cerebro-ponto-cerebellar pathways in the control of vergence eye movements. *Eye (Lond)* 10(Pt 2): 167-71.

García-Verdugo JM, Doetsch F, Wichterle H, Lim DA., Alvarez-Buylla A. 1998. Architecture and cell types of the adult subventricular zone: In search of the stem cells. *J Neurobiol* 36: 234-248.

Ghashghaei T, Lai C, Anton ES. 2007. Neuronal migration in the adult brain: are we there yet? *Nature Rev Neurosci* 8: 141-150.

Goldmann T, Printz M. 2013. Role of microglia in CNS autoimmunity 1. *Clin Dev Immunol* Volume 2013, Article ID 208093.

González-Forero D, de la Cruz RR, Delgado-García JM, Álvarez FJ, Pastor AM. 2003. Functional alterations of cat abducens neurons after peripheral tetanus neurotoxin injection. *J Neurophysiol* 89: 1878-1890.

González-Forero D, Pastor AM, Delgado-García JM, de la Cruz RR, Alvarez FJ. 2004. Synaptic structural modification following changes in activity induced by tetanus neurotoxin in cat abducens neurons. *J Comp Neurol* 471: 201–218.

Gordon CR, Caspi A, Levite R, Zivotofsky AZ. 2008. Mechanisms of vestibule-ocular reflex (VOR) cancellation in spinocerebellar ataxia type 3 (SCA-3) and episodic ataxia type 2 (EA-2). *Prog Brain Res* 171: 519-525.

Gottlieb JP, MacAvoy MG, Bruce CJ. 1994. Neural responses related to smooth-pursuit eye movements and their correspondence with electrically elicited smooth eye movements in the primate frontal eye field. *J Neurophysiol* 72(4): 1634-1653.

Grantyn A, Grantyn R. 1976. Synaptic actions of tectofugal pathways on abducens motoneurons in the cat. *Brain Res* 105(2): 269-85.

Grantyn A, Grantyn R. 1982. Axonal patterns and sites of termination of cat superior colliculus neurons projecting in the tecto-bulbo-spinal tract. *Exp Brain Res* 46: 243-256.

Grantyn A, Ong-Meang JV, Berthoz A. 1987. Reticulo-spinal neurons participating in the control of synergic eye and head movements during orientating in the cat. II. Morphological properties as revealed by intra-axonal injections of horseradish peroxidase. *Exp Brain Res* 66(2): 355-377.

Grantyn R, Baker R, Grantyn A. 1980. Morphological and physiological identification of excitatory pontine reticular neurons projecting to the cat abducens nucleus and spinal cord. *Brain Res* 198(1): 221-228.

Grantyn R, Grantyn A. 1978. Morphological and electrophysiological properties of cat abducens motoneurons. *Exp Brain Res* 31: 249-274.

Grantyn R, Grantyn A, Schaaf P. 1977. Conduction velocity, input resistance and size of cat ocular motoneurons stained with Procion yellow. *Brain Res* 135: 167-173.

Gudiño-Cabrera G, Pastor AM, de la Cruz RR, Delgado-García JM, Nieto-Sampedro M. 2000. Limits to the capacity of transplants of olfactory glia to promote axonal regrowth in the CNS. *Neuroreport* 11: 467–471.

Guéritaud JP. 1988. Electrical activity of rat ocular motoneurons recorded *in vitro*. *Neuroscience* 24: 837–852.

Gustaffson B, Pinter MJ. 1984. Influence of post-synaptic properties on the time course of synaptic potentials in different types of cat lumbar alpha-motoneurons. *Neurosci Lett* 51: 67-72.
Han X, Chen M, Wang F, Windrem M, Wang S, Shanz S, Xu Q, Oberheim NA, Bekar L, Betstadt S, Silva AJ, Takano T, Goldman SA., Nedergaard M. 2013. Forebrain engraftment by human glial progenitor cells enhances synaptic plasticity and learning in adult mice. *Cell Stem Cell* 12: 342–353.

Harada Y, Takahashi T. 1983. The calcium component of the action potential in spinal motoneurons of the rat. *J Physiol (Lond)* 335: 89–100.

Hayashida K, Clayton BA, Johnson JE, Eisenach JC. 2008. Brain derived neurotrophic factor induces spinal noradrenergic fiber sprouting and enhances clonidine analgesia following nerve injury in rats. *Pain* 136: 348-355.

Hazel TR, Sklavos SG, Dean P. 2002. Estimation of premotor synaptic drives to simulated abducens motoneurons for control of eye position. *Exp Brain Res* 146: 184–196.

Heckman CJ, Mottram C, Quinlan K, Theiss R, Schuster J. 2009. Motoneuron excitability: the importance of neuromodulatory inputs. *Clin Neurophysiol* 120: 2040–2054.

Helmchen C, Rambold H, Fuhry L, Büttner U. 1998. Deficits in vertical and torsional eye movements after uni- and bilateral muscimol inactivation of the interstitial nucleus of Cajal of the alert monkey. *Exp Brain Res* 119(4): 436-452.

Hempstead BL, Salzer JL. 2002. *Neurobiology. A glial spin on neurotrophins.* 298: 1184-1186.

Heyers D, Luksch H, Redies C. 2004. Selective synaptic cadherin expression by traced neurons of the chicken visual system. *Neurosci* 127: 901–912.

Hikosaka O, Igusa Y, Nakao S, Shimazu H. 1978. Direct inhibitory synaptic linkage of pontomedullary reticular burst neurons with abducens motoneurons in the cat. *Exp Brain Res* 33: 337–352.

Hille B. 1992. *Ionic Channels of Excitable Membranes (2nd ed).* Sunderland, MA: Sinauer.

Horn AK. 2006. The reticular formation. *Prog Brain Res* 151: 127-155.

Houngaard J, Kiehn O. 1989. Serotonin-induced bistability of turtle motoneurons caused by a nifedipine-sensitive calcium plateau potential. *J Physiol (Lond)* 414: 265–282.

Houngaard J, Kiehn O. 1993. Calcium spikes and calcium plateaux evoked by differential polarization in dendrites of turtle motoneurons *in vitro*. *J Physiol (Lond)* 468: 245–259.

- Hsiao CF, Chandler SH. 1995. Characteristics of a fast transient outward current in guinea pig trigeminal motoneurons. *Brain Res* 695: 217–226.
- Hsiao CF, Del Negro CA, Trueblood P, Chandler SH. 1998. The ionic basis for serotonin-induced bistable membrane properties in guinea pig trigeminal motoneurons. *J Neurophysiol* 79: 2847–2856.
- Huang EJ, Reichardt LF. 2001. Neurotrophins: roles in neuronal development and function. *Annu Rev Neurosci* 24: 677-736.
- Igusa A, Sasaki S, Shimazu H. 1980. Excitatory premotor burst neurons in the cat pontine reticular formation related to the quick phase of vestibular nystagmus. *Brain Res* 182: 451– 456.
- Imitola J, Park KI, Teng YD, Nisim S, Lachyankar M, Ourednik J, Mueller FJ, Yiou R, Atala A, Sidman RL, Tuszynski M, Houry SJ, Snyder EY. 2004. Stem cells: cross-talk and developmental programs. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 359(1445): 823-837.
- Ishii Y, Matsumoto Y, Watanabe R, Elmi M, Fujimori T, Nissen J, Cao Y, Nabeshima Y, Sasahara M, Funa K. 2008. Characterization of neuroprogenitor cells expressing the PDGF beta-receptor within the subventricular zone of postnatal mice. *Mol Cell Neurosci* 37(3): 507-518.
- Jin K, Zhu Y, Sun Y, Mao XO, Xie L, Greenberg DA. 2002. Vascular endothelial growth factor (VEGF) stimulates neurogenesis in vitro and in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99: 11946-11950.
- Jones LL, Sajed D, Tuszynski MH. 2003. Axonal regeneration through regions of chondroitin sulfate proteoglycan deposition after spinal cord injury: a balance of permissiveness and inhibition. *J Neurosci* 23: 9276-9288.
- Johnson EO, Zoubos AB, Soucacos PN. 2005. Regeneration and repair of peripheral nerves. *Injury*. 36 Suppl 4: 24-9.
- Johnson JL, Sharpe JA. 1994. The initial vestibulo-ocular reflex and its visual enhancement and cancellation in humans. *Exp Brain Res* 99(2): 302-308.
- Judge SJ, Cumming BG. 1986. Neurons in the monkey midbrain with activity related to vergence eye movement and accommodation. *J Neurophysiol* 55(5): 915-30.
- Kernell D. 2006. *The motoneuron and its muscle fibres*. Oxford: Oxford University Press.
- Kettenmann H, Verkhratsky A. 2011. Neuroglia--living nerve glue. *Fortschr Neurol Psychiatr* 79: 588–97.
- Kirschenbaum B, Goldman SA. 1995. Brain-derived neurotrophic factor promotes the survival of neurons arising from the adult rat forebrain subependymal zone. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92: 210–214.
- Kobayashi M, Inoue T, Matsuo R, Masuda Y, Hidaka O, Kang Y, Morimoto T. 1997. Role of calcium conductances on spike afterpotentials in rat trigeminal motoneurons. *J Neurophysiol* 77: 3273–3283.

Koeberle PD, Bähr M. 2008. The upregulation of GLAST-1 is an indirect antiapoptotic mechanism of GDNF and neurturin in the adult CNS. *Cell Death Differ* 15: 471-483.

Krauzlis RJ. 2004. Recasting the smooth pursuit eye movement system. *J Neurophysiol* 91(2): 591-603.

Krauzlis RJ, Lisberger SG. 1996. Directional organization of eye movement and visual signals on the floccular lobe of the monkey cerebellum. *Exp Brain Res* 109(2): 289-302.

Kuno M, Llinás R. 1970. Alterations of synaptic action in chromatolysed motoneurons of the cat. *J Physiol* 210: 823-838.

Kuno M, Llinás R. 1970 b. Enhancement of synaptic transmission by dendritic potentials in chromatolysed motoneurons of the cat. *J Physiol* 210: 807-821.

Kus L, Borys E, Chu YP, Ferguson SM, Blakely RD, Emborg ME, Kordower JH, Levey AI, Mufson EJ. 2003. Distribution of high affinity choline transporter immunoreactivity in the primate central nervous system. *J Comp Neurol* 463: 341–357.

Lambrechts D, Storkebaum E, Morimoto M, Del-Favero J, Desmet F, Marklund SL, Wyns S, Thijs V, Andersson J, van Marion I, Al-Chalabi A, Bornes S, Musson R, Hansen V, Beckman L, Adolfsson R, Pall HS, Prats H, Vermeire S, Rutgeerts P, Katayama S, Awata T, Leigh N, Lang-Lazdunski L, Dewerchin M, Shaw C, Moons L, Vlietinck R, Morrison KE, Robberecht W, van Broeckhoven C, Collen D, Andersen PM, Carmeliet P. 2003. VEGF is modifier of amyotrophic lateral sclerosis in mice and humans and protects motoneurons against ischemic death. *Nat Genet* 34: 383-394.

Langer T, Fuchs AF, Chubb MC, Scudder CA, Lisberger SG. 1985. Floccular efferents in the rhesus macaque as revealed by autoradiography and horseradish peroxidase. *J Comp Neurol* 235(1): 26-37.

Larkman PM, Kelly JS. 1992. Ionic mechanisms mediating 5-hydroxytryptamine- and noradrenaline-evoked depolarization of adult rat facial motoneurons. *J Physiol (Lond)* 456: 473–490.

Lee R, Kermani P, Teng KK, Hempstead BL. 2001. Regulation of cell survival by secreted proneurotrophins. *Science* 294: 1945-1948.

Levi-Montalcini R. 1982. Developmental neurobiology and the natural history of nerve growth factor. *Annu Rev Neurosci* 5: 341-362.

Li J, Imitola J, Snyder EY, Sidman RL. 2006. Neural stem cells rescue nervous Purkinje neurons by restoring molecular homeostasis of tissue plasminogen activator and downstream targets. *J Neurosci* 26: 7839 –7848.

Lim DA, Huang YC, Alvarez-Buylla A. 2007. The adult neural stem cell niche: lessons for future neural cell replacement strategies. *Neurosurg Clin N Am* 18(1): 81-92.

Lim DA, Tramontin AD, Trevejo JM, Herrera DG, García-Verdugo JM, Alvarez-Buylla A. 2000. Noggin antagonizes BMP signaling to create a niche for adult neurogenesis. *Neuron* 28: 713–726.

- Ling L, Fuchs A, Siebold C, Dean P. 2007. Effects of initial eye position on saccade-related behavior of abducens nucleus neurons in the primate. *J Neurophysiol* 98: 3581–3599.
- Lisberger SG. 1994. Neural basis for motor learning in the vestibuloocular reflex of primates. III. Computational and behavioral analysis of the sites of learning. *J Neurophysiol* 72(2): 974-998.
- Lisberger SG, Evinger C, Johanson GW, Fuchs AF. 1981. Relationship between eye acceleration and retinal image velocity during foveal smooth pursuit in man and monkey. *J Neurophysiol* 46(2): 229-249.
- Lisberger SG, Miles FA, Zee DS. 1984. Signals used to compute errors in monkey vestibuloocular reflex: possible role of flocculus. *J Neurophysiol* 52(6): 1140-1153.
- Llinás R, Baker R. 1972. A chloride-dependent inhibitory postsynaptic potential in cat trochlear motoneurons. *J Neurophysiol* 35: 484–492.
- Lois C, Alvarez-Buylla A. 1993. Proliferating subventricular zone cells in the adult mammalian forebrain can differentiate into neurons and glia. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90: 2074 –2077.
- Lois C, García-Verdugo JM, Alvarez-Buylla A. 1996. Chain migration of neuronal precursors. *Science* 271: 978–81.
- Luskin MB. 1993. Restricted proliferation and migration of postnatally generated neurons derived from the forebrain subventricular zone. *Neuron* 11: 173–189.
- Lynch JC, Tian JR. 2006. Cortico-cortical networks and cortico-subcortical loops for the higher control of eye movements. *Prog Brain Res* 151: 461-501.
- Madhavan L, Ourednik V, Ourednik J. 2008. Neural stem/progenitor cells initiate the formation of cellular networks that provide neuroprotection by growth factor-modulated antioxidant expression. *Stem Cells* 26(1): 254-265.
- Maisonpierre PC, Le Beau MM, Espinosa R 3rd, Ip NY, Belluscio L, de la Monte SM, Squinto S, Furth ME, Yancopoulos GD. 1991. Human and rat brain-derived neurotrophic factor and neurotrophin-3: gene structures, distributions, and chromosomal localizations. *Genomics* 10: 558–568.
- Martin LJ, Price AC, McClendon KB, Al-Abdulla NA, Subramaniam JR, Wong PC, Liu Z. Early events of target deprivation/axotomy-induced neuronal apoptosis in vivo: oxidative stress, DNA damage, p53 phosphorylation and subcellular redistribution of death proteins. *J Neurochem* 85: 234-247.
- Martino G, Pluchino S. 2006. The therapeutic potential of neural stem cells. *Nat Rev Neurosci* 7(5): 395-406.
- Martino G, Pluchino S, Bonfanti L, Schwartz M. 2011. Brain regeneration in physiology and pathology: the immune signature driving therapeutic plasticity of neural stem cells. *Physiol Rev* 91(4): 1281-1304.

Mathieu P, Battista D, Depino A, Roca V, Graciarena M, Pitossi F. 2010. The more you have, the less you get: the functional role of inflammation on neuronal differentiation of endogenous and transplanted neural stem cells in the adult brain. *J Neurochem* 112: 1368-1385.

Maurer MH, Tripps WK, Feldmann RE Jr, Kuschinsky W. 2003. Expression of vascular endothelial growth factor and its receptors in rat neural stem cells. *Neurosci Lett* 344: 165–168.

Mays LE. 1984. Neural control of vergence eye movements: convergence and divergence neurons in midbrain. *J Neurophysiol* 51(5): 1091-1108.

Mays LE, Porter JD. 1984. Neural control of vergence eye movements: activity of abducens and oculomotor neurons. *J Neurophysiol* 52(4): 743-761.

Mays LE, Porter JD, Gamlin PD, Tello CA. 1986. Neural control of vergence eye movements: neurons encoding vergence velocity. *J Neurophysiol* 56: 1007-1021.

McCloskey DP, Croll SD, Scharfman HE. 2005. Depression of synaptic transmission by vascular endothelial growth factor in adult rat hippocampus and evidence for increased efficacy after chronic seizures. *J Neurosci* 25: 8889–8897.

McCloskey DP, Hintz TM, Scharfman HE. 2008. Modulation of vascular endothelial growth factor (VEGF) expression in motor neurons and its electrophysiological effects. *Brain Res Bull* 76: 36–44.

McClung JR, Shall MS, Goldberg SJ. 2001. Motoneurons of the lateral and medial rectus extraocular muscles in squirrel monkey and cat. *Cells Tissues Organs* 168: 220-227.

McCrea RA, Baker R. 1985. Anatomical connections of the nucleus prepositus of the cat. *J Comp Neurol* 237: 377-407.

McCrea RA, Strassman A, May E, Highstein SM. 1987. Anatomical and physiological characteristics of vestibular neurons mediating the horizontal vestibule-ocular reflex of the squirrel monkey. *J Comp Neurol* 264: 547-570.

Merkle FT, Tramontin AD, García-Verdugo JM, Alvarez-Buylla A. 2004. Radial glia give rise to adult neural stem cells in the subventricular zone. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101: 17528–17532.

Metcalf D. 1896. Haemopoietic growth factors now cloned. *Br J Haematol* 62: 409-412.

Ming G, Song H. 2011. Adult neurogenesis in the mammalian brain: significant answers and significant questions. *Neuron* 70: 687–702.

Mirzadeh Z, Merkle FT, Soriano-Navarro M, García-Verdugo JM, Alvarez-Buylla A. 2009. Neural stem cells confer unique pinwheel architecture to the ventricular surface in neurogenic regions of the adult brain. *Cell Stem Cell* 3: 265–278.

Mirzadeh Z, Han Y, Soriano-Navarro M, García- JM, Alvarez-Buylla A. 2010. Cilia organize ependymal planar polarity. *J. Neurosci* 30: 2600–2610.

Miyazaki S. 1985. Localization of motoneurons in the oculomotor nucleus and their axons in the oculomotor nerve. *Brain Res* 348(1) :57-63.

- Morcuende S, Matarredona ER, Benítez-Temiño B, Muñoz-Hernández R, Pastor AM, de la Cruz RR. 2011. Differential regulation of the expression of neurotrophin receptors in rat extraocular motoneurons after lesion. *J Comp Neurol* 519: 2335–2352.
- Morcuende S, Silva-Hucha S, García-Hernández R, Benítez-Temiño B, de la Cruz RR, Pastor AM. 2014. Expression of vascular endothelial growth factor (VEGF) and its receptor Flk-1 in oculomotor system of the rat. 9th FENS Forum of Neuroscience, Milán, Italia, Julio 2014.
- Mori T, Buffo A, Götz M. 2005. The novel roles of glial cells revisited: the contribution of radial glia and astrocytes to neurogenesis. *Curr Top Dev Biol* 69: 67–99.
- Mosfeldt Laursen A, Rekling JC. 1989. Electrophysiological properties of hypoglossal motoneurons of guinea-pigs studied *in vitro*. *Neuroscience* 30: 619–637.
- Murphy EH, Garone M, Tashawod D, Baker RB. 1986. Innervation of extraocular muscles in the rabbit. *J Comp Neurol* 254(1): 78-90.
- Nakamagoe K, Iwamoto Y, Yoshida K. 2000. Evidence for brainstem structures participating in oculomotor integration. *Science* 288(5467): 857-859.
- Navarro X, Vivó M, Valero-Cabré A. 2007. Neural plasticity after peripheral nerve injury and regeneration. *Prog Neurobiol* 82: 163–201.
- Newlands SD, Perachio AA. 2003. Central projections of the vestibular nerve: a review and single fiber study in the Mongolian gerbil. *Brain Res Bull* 60(5-6): 475-495.
- Nguyen LT, Spencer RF. 1999. Abducens internuclear and ascending tract of Deiters inputs to medial rectus motoneurons in the cat oculomotor nucleus: neurotransmitters. *J Comp Neurol* 411: 73–86.
- Nichols CG, Lopatin AN. 1997. Inward rectifier potassium channels. *Annu Rev Physiol* 59: 171–191.
- Nieto-González JL, Carrascal L, Núñez-Abades P, Torres B. 2009. Muscarinic modulation of recruitment threshold and firing rate in rat oculomotor nucleus motoneurons. *J Neurophysiol* 101: 100–111.
- Nieto-González JL, Carrascal L, Núñez-Abades P, Torres B. 2007. Phasic and tonic firing properties in rat oculomotor nucleus motoneurons, studied *in vitro*. *Eur J Neurosci* 25: 2682–2696.
- Nottebohm F. 1985. Neuronal replacement in adulthood. *Ann N Y Acad Sci* 457: 143-161.
- Novikov LN, Novikova LN, Holmberg P, Kellerth J. 2000. Exogenous brain-derived neurotrophic factor regulates the synaptic composition of axonally lesioned and normal adult rat motoneurons. *Neuroscience* 100: 171-181.
- Nowacka MM, Obuchowicz E. 2012. Vascular endothelial growth factor (VEGF) and its role in the central nervous system: a new element in the neurotrophic hypothesis of antidepressant drug action. *Neuropeptides* 46: 1-10.

- Ogata N, Ohishi Y. 2002. Molecular diversity of structure and function of the voltage-gated Na⁺ channels. *Jpn J Pharmacol* 88: 365-377.
- Ohki Y, Shimazu H, Suzuki I. 1988. Excitatory input to burst neurons from the labyrinth and its mediating pathway in the cat: location and functional characteristics of burster-driving neurons. *Exp Brain Res* 72(3): 457-472.
- Oka S, Honmou O, Akiyama Y, Sasaki M, Houkin K, Hashi K, Kocsis JD. 2004. Autologous transplantation of expanded neural precursor cells into the demyelinated monkey spinal cord. *Brain Res* 1030: 94–102.
- Oppenheim RW, Yin QW, Pevette D, Yan Q. 1992. Brain-derived neurotrophic factor rescues developing avian motoneurons from cell death. *Nature* 360: 755-757.
- Pape HC. 1996. Queer current and pacemaker: the hyperpolarization activated cation current in neurons. *Annu Rev Physiol* 58: 299–327.
- Park H, Poo MM. 2013. Neurotrophin regulation of neural circuit development and function. *Nat Rev Neurosci* 14: 7–23.
- Pastor AM, Delgado-García JM, Martínez-Guijarro FJ, López-García C, de la Cruz RR. 2000. Response of abducens internuclear neurons to axotomy in the adult cat. *J Comp Neurol* 427: 370–390.
- Pastor AM, González-Forero D. 2003. Recruitment order of cat abducens motoneurons and internuclear neurons. *J Neurophysiol* 90: 2240–2252.
- Pastor AM, Moreno-López B, de la Cruz RR, Delgado-García JM. 1997. Effects of botulinum neurotoxin type A on abducens motoneurons in the cat: ultrastructural and synaptic alterations. *Neuroscience* 81: 457–478.
- Perea G, Araque A. 2010. Glia modulates synaptic transmission. *Brain Res Rev* 63: 93–102.
- Peters A, Palay SL, Webster HdeF. 1991. The fine structure of the nervous system. Neurons and their supporting cells. Oxford University Press. New York. 169-186.
- Pluchino S, Martino G. 2005. The therapeutic use of stem cells for myelin repair in autoimmune demyelinating disorders. *J Neurol Sci* 233: 117–119.
- Pluchino S, Zanotti L, Deledi M, Martino G. 2005. Neural stem cells and their use as therapeutic tool in neurological disorders. *Brain Res Rev* 48: 211-219.
- Precht W and Baker R. 1972. Synaptic organization of the vestibulo-trochlear pathway. *Exp Brain Res* 14: 158–184.
- Purves D, Snider WD, Voyvodic JT. 1990. Body and brain, a trophic theory of neural connections. Cambridge: Harvard University Press.
- Rekling JC, Funk GD, Bayliss DA, Dong XW, Feldman JL. 2000. Synaptic control of motoneuronal excitability. *Physiol Rev* 80: 767-852.

Reynolds BA, Tetzlaff W, Weiss S. 1992. A multipotent EGF-responsive striatal embryonic progenitor cell produces neurons and astrocytes. *J Neurosci* 12: 4565–4574.

Reynolds BA, Weiss S. 1992. Generation of neurons and astrocytes from isolated cells of adult mammalian central nervous system. *Science* 255: 1707–1710.

Ribotta MG, Privat VM. 2001. The role of astrocytes in axonal regeneration in the mammalian CNS. *Prog Brain Res* 132: 587–610.

Rind HB, Butowt R, von Bartheld CS. 2005. Synaptic targeting of retrogradely transported trophic factors in motoneurons: comparison of glial cell line-derived neurotrophic factor, brain-derived neurotrophic factor and cardiotrophin-1 with tetanus toxin. *J Neurosci* 25: 539–549.

Robinson DA. 1964. The mechanics of human saccadic eye movement. *J Physiol* 174: 245-264.

Robinson DA. 1965. The mechanics of human smooth pursuit eye movement. *J Physiol* 180(3): 569-91.

Robinson DA. 1975. Oculomotor control signals. Basic mechanisms of ocular motility and their clinical implications. Lennerstrand G y Bach&Rita P (Eds) Pergamon Press. Londres. 337-374.

Robinson DA. 1981. The use of control systems analysis in the neurophysiology of eye movements. *Annu Rev Neurosci* 4: 463–503.

Rosenthal A, Goeddel DV, Nguyen T, Lewis M, Shih A, Laramée GR, Nikolics K, Winslow JW. 1990. Primary structure and biological activity of a novel human neurotrophic factor. *Neuron* 4: 767-773.

Roy JE, Cullen KE. 2003. Brain stem pursuit pathways: dissociating visual, vestibular, and proprioceptive inputs during combined eye-head gaze tracking. *J Neurophysiol* 90(1): 271-290.

Rudy B. 1988. Diversity and ubiquity of K channels. *Neuroscience* 25: 729–749.

Ruiz de Almodovar C, Fabre PJ, Knevels E, Coulon C, Segura I, Haddick PC, Aerts L, Delattin N, Strasser G, Oh WJ, Lange C, Vinckier S, Haigh J, Fouquet C, Gu C, Alitalo K, Castellani V, Tessier-Lavigne M, Chedotal A, Charron F, Carmeliet P. 2011. VEGF mediates commissural axon chemoattraction through its receptor Flk1. *Neuron* 70: 966–978.

Russier M, Carlier E, Ankri N, Fronzaroli L, Debanne D. 2003. A-, T-, and H-type currents shape intrinsic firing of developing rat abducens motoneurons, *J Physiol* 549: 21–36.

Sabelström H, Stenudd M, Réu P, Dias DO, Elfineh M, Zdunek S, Damberg P, Göritz C, Frisé J. 2013. Resident neural stem cells restrict tissue damage and neuronal loss after spinal cord injury in mice. *Science* 342: 637–40.

Safronov BV, Vogel W. 1995. Single voltage-activated Na⁺ and K⁺ channels in the somata of rat motoneurons. *J Physiol (Lond)* 487: 91–106.

Safronov BV, Vogel W. 1996. Properties and functions of Na⁺-activated K⁺ channels in the soma of rat motoneurons. *J Physiol (Lond)* 497: 727–734.

Saijo K, Glass CK. 2011. Microglial cell origin and phenotypes in health and disease. *Nat Rev Immunol* 11: 775–787.

Salama-Cohen P, Arévalo MA, Grantyn R, Rodríguez-Tébar A. 2006. Notch and GF/p75NTR control dendrite morphology and the balance of excitatory/inhibitory synaptic input to hippocampal neurones through Neurogenin 3. *J Neurochem* 97: 1269–1278.

Sasaki K. 1963. Electrophysiological studies on oculomotor neurons of the cat. *Jap J Physiol* 13: 287–302.

Sathasivam S. 2008. VEGF and ALS. *Neurosci Res* 62: 71–77.

Scudder CA, Kaneko CS, Fuchs AF. 2002. The brainstem burst generator for saccadic eye movements: a modern synthesis. *Exp Brain Res* 142(4): 439-462.

Seri B, Herrera DG, Gritti A., Ferron S, Collado L, Vescovi A., Garcia-Verdugo JM, Alvarez-Buylla A. 2006. Composition and organization of the SCZ: A large germinal layer containing neural stem cells in the adult mammalian brain. *Cereb Cortex* 16: 103-111.

Sköld MK, Kanje M. 2008. Vascular endothelial growth factor in central nervous system injuries – a vascular growth factor getting nervous? *Curr Neurovasc Res* 5: 246-259.

Snapyan M, Lemasson M, Brill MS, Blais M, Massouh M, Ninkovic J, Gravel C, Berthod F, Götz M, Barker P a, Parent A, Saghatelian A. 2009. Vasculature guides migrating neuronal precursors in the adult mammalian forebrain via brain-derived neurotrophic factor signaling. *J Neurosci* 29: 4172–4188.

Spencer RF, Wang SF. 1996. Immunohistochemical localization of neurotransmitters utilized by neurons in the rostral interstitial nucleus of the medial longitudinal fasciculus (riMLF) that project to the oculomotor and trochlear nuclei in the cat. *J Comp Neurol* 366: 134–148.

Steiger HJ, Büttner-Ennever J. 1978. Relationship between motoneurons and internuclear neurons in the abducens nucleus: a double retrograde tracer study in the cat. *Brain Res* 148(1): 181-188.

Storkebaum E, Lambrechts D, Dewerchin M, Moreno-Murciano MP, Appelmans S, Oh H, Van Damme P, Rutten B, Man WY, De Mol M, Wyns S, Manka D, Vermeulen K, Van Den Bosch L, Mertens N, Schmitz C, Robberecht W, Conway EM, Collen D, Moons L, Carmeliet P. 2005. Treatment of motoneuron degeneration by intracerebroventricular delivery of VEGF in a rat model of ALS. *Nat Neurosci* 8: 85–92.

Straka H, Dieringer N. 2004. Basic organization principles of the VOR: lessons from frogs. *Prog Neurobiol* 73(4): 259-309.

Sumner BE. 1975. An ultrastructural study of normal and injured hypoglossal nuclei after injection of horseradish peroxidase. *Exp Brain Res* 23: 463– 470.

Svensson M, Eriksson P, Persson JK, Molander C, Arvidsson J, Aldskogius H. 1993. The response of central glia to peripheral nerve injury. *Brain Res Bull* 30: 499-506.

- Svirskis G, Hounsgaard J. 1998. Transmitter regulation of plateau properties in turtle motoneurons. *J Neurophysiol* 79: 45–50.
- Sylvestre PA, Cullen KE. 1999. Quantitative analysis of abducens neuron discharge dynamics during saccadic and slow eye movements. *J Neurophysiol* 82: 2612–2632.
- Takahashi T. 1990a. Inward rectification in neonatal rat spinal motoneurons. *J Physiol (Lond)* 423: 47–62.
- Takahashi T. 1990b. Membrane currents in visually identified motoneurons of neonatal rat spinal cord. *J Physiol (Lond)* 423: 27–46.
- Talaverón R, Matarredona ER, de la Cruz RR, Pastor AM. 2013. Neural progenitor cell implants modulate vascular endothelial growth factor and brain-derived neurotrophic factor expression in rat axotomized neurons. *PLoS One* 8: e54519.
- Talaverón R, Matarredona ER, de la Cruz RR, Macías D, Gálvez V, Pastor AM. 2014. Implanted neural progenitor cells regulate glial reaction to brain injury and establish gap junctions with host glial cells. *Glia* 62: 623-638.
- Tanaka M, Lisberger SG. 2002. Role of arcuate frontal cortex of monkeys in smooth pursuit eye movements. I. Basic response properties to retinal image motion and position. *J Neurophysiol* 87: 2684-2699.
- Taupin P. 2006. Therapeutic potential of adult neural stem cells. *Recent Pat CNS Drug Discov* 1: 299–303.
- Terenghi G. 1999. Peripheral nerve regeneration and neurotrophic factors. *J Anat* 194: 1-14.
- Titmus MJ, Faber DS. 1990. Axotomy-induced alterations in the electrophysiological characteristics of neurons. *Prog Neurobiol* 35: 1–51.
- Tolosa L, Mir M, Asensio VJ, Olmos G, Lladó J. 2008. Vascular endothelial growth factor protects spinal cord motoneurons against glutamate-induced excitotoxicity via phosphatidylinositol 3-kinase. *J Neurochem* 105: 1080–1090.
- Tonchev AB, Yamashita T, Guo J, Chaldakov GN, Takakura N. 2007. Expression of angiogenic and neurotrophic factors in the progenitor cell niche of adult monkey subventricular zone. *Neuroscience* 144: 1425–1435.
- Torroglosa A, Murillo-Carretero M, Romero-Grimaldi C, Matarredona ER, Campos-Caro A, Estrada C. 2007. Nitric oxide decreases subventricular zone stem cell proliferation by inhibition of epidermal growth factor receptor and phosphoinositide-3-kinase/Akt pathway. *Stem Cells* 25(1): 88-97.
- Tovar-Y-Romo LB, Tapia R. 2010. VEGF protects spinal motor neurons against chronic excitotoxic degeneration in vivo by activation of the PI3-K pathway and inhibition of p38MAPK. *J Neurochem* 115: 1090–1101.

Tsuzuki S, Yoshida S, Yamamoto T, Oka H. 1995. Developmental changes in the electrophysiological properties of neonatal rat of oculomotor neuron studied *in vitro*. *Neurosci Res* 23: 389–397.

Tsupykov O, Kyryk V, Smozhanik E, Rybachuk O, Butenko G, Pivneva T, Skibo G. 2014. Long-term fate of grafted hippocampal neural progenitor cells following ischemic injury. *J Neurosci Res* 92(8): 964-974.

Uchino Y, Sasaki M, Isu N, Hirai N, Imagawa M, Endo K, Graf W. 1994. Second-order vestibular neuron morphology of the extra-MLF anterior canal pathway in the cat. *Exp Brain Res* 97(3): 387-396.

Umemiya M, Berger AJ. 1994. Properties and function of low and high-voltage-activated Ca²⁺ channels in hypoglossal motoneurons. *J Neurosci* 14: 5652–5660.

Ungless MA, Gasull X, Walters ET. 2002. Long-term alteration of S-type potassium current and passive membrane properties in aplysia sensory neurons following axotomy. *J Neurophysiol* 87(5): 2408-2420.

van Leeuwen AF, Collewijn H, Erkelens CJ. 1998. Dynamics of horizontal vergence movements: interaction with horizontal and vertical saccades and relation with monocular preferences. *Vision Res* 38: 3943-3954.

Verkhratsky A, Butt A. 2007. *Glial Neurobiology: A Textbook*. John Wiley & Sons, Ltd.

Viana F, Bayliss DA, Berger AJ. 1993a. Multiple potassium conductances and their role in action potential repolarization and repetitive firing behavior of neonatal rat hypoglossal motoneurons. *J Neurophysiol* 69: 2150–2163.

Viana F, Bayliss DA, Berger AJ. 1993b. Calcium conductances and their role in the firing behavior of neonatal rat hypoglossal motoneurons. *J Neurophysiol* 69: 2137–2149.

Viana F, Bayliss DA, Berger AJ. 1994. Postnatal changes in rat hypoglossal motoneuron membrane properties. *Neuroscience* 59: 131–148.

Wang L, Martin DR, Baker HJ, Zinn KR, Kappes JC, Ding H, Gentry AS, Harper S, Snyder EY, Cox NR. 2007. Neural progenitor cell transplantation and imaging in a large animal model. *Neuroscience Research* 59: 327-340.

Webber CA, Xu Y, Vanneste KJ, Martinez JA, Verge VM, Zochodne DW. 2008. Guiding adult mammalian sensory axons during regeneration. *J Neuropathol Exp Neurol* 67: 212-22.

Whitman MC, Greer CA. 2009. Adult neurogenesis and the olfactory system. *Prog Neurobiol* 89: 162–175.

Whittemore SR, Friedman PL, Larhammar D, Persson H, Gonzalez-Carvajal M, Holets VR. 1988. Rat beta-nerve growth factor sequence and site of synthesis in the adult hippocampus. *J Neurosci Res* 20: 403–410.

Widenfalk J, Lipson A, Jubran M, Hofstetter C, Ebendal T, Cao Y, Olson L. 2003. Vascular endothelial growth factor improves functional outcome and decreases secondary degeneration in experimental spinal cord contusion injury. *Neuroscience* 120: 951-960.

Wisden W, Morris BJ. 2002. In situ hybridization with oligonucleotide probes. *Int Rev Neurobiol* 47: 3-59.

Yano H, Chao MV. 2000. Neurotrophin receptor structure and interactions. *Pharm Acta Helv* 74: 253-260.

Yuan, TF, Lian YX, So KF. 2015. Response: New neurons from old beliefs in the adult piriform cortex? A Commentary on: occurrence of new neurons in the piriform cortex. *Front Neuroanat* 9: 1-2.

Zachary I. 2005. Neuroprotective role of vascular endothelial growth factor: signalling mechanisms, biological function, and therapeutical potential. *Neurosignals* 14: 207-221.

Zeng J, Powers RK, Newkirk G, Yonkers M, Binder MD. 2005. Contribution of persistent sodium currents to spike-frequency adaptation in rat hypoglossal motoneurons. *J Neurophysiol* 93: 1035-1041.

Zhang H, Gamlin PD. 1998. Neurons in the posterior interposed nucleus of the cerebellum related to vergence and accommodation. I. Steady-state characteristics. *J Neurophysiol* 79(3): 1255-1269.

Zhang Y, Mays LE, Gamlin PD. 1992. Characteristics of near response cells projecting to the oculomotor nucleus. *J Neurophysiol* 67(4): 944-960.

Zhao M, Momma S, Delfani K, Carlen M, Cassidy RM, Johansson CB, Brismar H, Shupliakov O, Frisen J, Janson AM. 2003. Evidence for neurogenesis in the adult mammalian substantia nigra. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100: 7925-7930.

Zhou Z, Liu Q, Davis RL. 2005. Complex regulation of spiral ganglion neuron firing patterns by neurotrophin-3. *J Neurosci* 25: 7558-7566.

Zigova T, Pencea V, Wiegand SJ, Luskin MB. 1998. Intraventricular administration of BDNF increases the number of newly generated neurons in the adult olfactory bulb. *Mol Cell Neurosci* 245: 234-245.

APÉNDICE

ARTÍCULO PUBLICADO CON LOS RESULTADOS DE LA PRESENTE TESIS DOCTORAL:

Morado-Díaz CJ, Matarredona ER, Morcuende S, Talaverón R, Davis-López de Carrizosa MA, de la Cruz RR, Pastor AM. 2014. Neural progenitor cell implants in the lesioned medial longitudinal fascicle of adult cats regulate synaptic composition and firing properties of abducens internuclear neurons. J Neurosci 34: 7007-7017.

Neural Progenitor Cell Implants in the Lesioned Medial Longitudinal Fascicle of Adult Cats Regulate Synaptic Composition and Firing Properties of Abducens Internuclear Neurons

Camilo J. Morado-Díaz, Esperanza R. Matarredona, Sara Morcuende, Rocío Talaverón, María A. Davis-López de Carrizosa, Rosa R. de la Cruz, and Angel M. Pastor

Departamento de Fisiología, Facultad de Biología, Universidad de Sevilla, 41012 Sevilla, Spain

Transplants of neural progenitor cells (NPCs) into the injured CNS have been proposed as a powerful tool for brain repair, but, to date, few studies on the physiological response of host neurons have been reported. Therefore, we explored the effects of NPC implants on the discharge characteristics and synaptology of axotomized abducens internuclear neurons, which mediate gaze conjugacy for horizontal eye movements. NPCs were isolated from the subventricular zone of neonatal cats and implanted at the site of transection in the medial longitudinal fascicle of adult cats. Abducens internuclear neurons of host animals showed a complete restoration of axotomy-induced alterations in eye position sensitivity, but eye velocity sensitivity was only partially regained. Analysis of the inhibitory and excitatory components of the discharge revealed a normal re-establishment of inhibitory inputs, but only partial re-establishment of excitatory inputs. Moreover, their inhibitory terminal coverage was similar to that in controls, indicating that there was ultimately no loss of inhibitory synaptic inputs. Somatic coverage by synaptophysin-positive contacts, however, showed intermediate values between control animals and animals that had undergone axotomy, likely due to partial loss of excitatory inputs. We also demonstrated that severed axons synaptically contacted NPCs, most of which were VEGF immunopositive, and that abducens internuclear neurons expressed the VEGF receptor Flk1. Together, our results suggest that VEGF neurotrophic support might underlie the increased inhibitory-to-excitatory balance observed in the postimplant cells. The noteworthy improvement of firing properties of injured neurons following NPC implants indicates that these cells might provide a promising therapeutic strategy after neuronal lesions.

Key words: abducens; eye movements; motoneuron; oculomotor; plasticity

Introduction

Neuronal circuits are typically envisaged as providing a downstream flow of information, in the form of spikes, from afferent neurons to their target neurons, muscle fibers, or glands. However, it should be stressed that there is an equally important information flow that courses upstream in the form of target-derived factors, that is, retrogradely from the target tissue to the innervating cells (Chao, 2003; Rind et al., 2005). Whenever the trophic supply between connected cells is interrupted, for instance by axotomy, a number of deleterious effects appear,

ranging from cell death to a wealth of metabolic and electrophysiological changes that impact the synaptic and firing properties of neurons (Titmus and Faber, 1990). These alterations revert to a certain extent when new targets are provided (de la Cruz et al., 1996; Benítez-Temiño et al., 2005; Navarro et al., 2007). Moreover, individual factors derived from target neurons applied to the stump of the severed axons selectively regulate tonic and phasic firing properties (Davis-López de Carrizosa et al., 2009). Thus, those experiments indicate that the target is a powerful phenotypic regulator of the innervating neuron (Park and Poo, 2013).

As a proof of concept, we sought to deliver at the site of a central lesion in the medial longitudinal fascicle (MLF) neural progenitor cells that have the potential not only to integrate within the scaffold of cells in the host tissue (Cusimano et al., 2012; Fagerlund et al., 2012), but also to deliver trophic factors such as nerve growth factor (NGF), brain-derived neurotrophic factor (BDNF), neurotrophin-3 (NT-3), and vascular endothelial growth factor (VEGF; Tonchev et al., 2007). The synaptotrophic action of these factors is supported by the fact that their delivery modifies synaptic and discharge characteristics of neurons (Zhou et al., 2005; Boyce et al., 2012). Sectioning the MLF is a useful tool

Received Oct. 2, 2013; revised March 17, 2014; accepted April 16, 2014.

Author contributions: E.R.M., R.R.d.J.C., and A.M.P. designed research; C.J.M.-D., E.R.M., S.M., R.T., M.A.D.-L.d.C., and A.M.P. performed research; C.J.M.-D., E.R.M., S.M., R.T., M.D.-L.d.C., and R.R.d.J.C. analyzed data; R.R.d.J.C. and A.M.P. wrote the paper.

This work was supported by the Ministerio de Economía y Competitividad-Fondo Europeo de Desarrollo Regional Grants BFU2009-07121 and BFU2012-33975, and Junta de Andalucía Grant CVI-6053. Electron microscopy and cell culture was performed in the central research services of Universidad de Sevilla. We thank Dr. David Macías for providing us with the lentiviral vector. We also thank Dr. Paul J. May for English language revisions in the manuscript. This article is dedicated to the memory of Professor Steve M. Highstein.

Correspondence should be addressed to Dr. Angel M. Pastor, Departamento de Fisiología, Facultad de Biología, Avenida Reina Mercedes, 6, 41012-Sevilla, Spain. E-mail: ampastor@us.es.

DOI:10.1523/JNEUROSCI.4231-13.2014

Copyright © 2014 the authors 0270-6474/14/347007-11\$15.00/0

for affecting a well defined neuronal population, the abducens internuclear neurons, in a brainstem pathway for oculomotor control (Delgado-García et al., 1986b). We have previously demonstrated that axotomized abducens internuclear neurons survive the interruption of their axons after transecting the MLF, but exhibit a series of long-lasting modifications of their discharge activity and synaptic inputs (de la Cruz et al., 2000), as they remain targetless (Pastor et al., 2000).

Here, we aimed to provide axotomized abducens internuclear neurons with neural progenitor cells implanted at the site of a lesion. Our findings indicate that neural progenitor cells are able to rescue, to a large extent, the discharge characteristics and afferent inputs of axotomized neurons, but with an imbalance in favor of inhibition. Likely, neurotrophic factors delivered by the neural progenitor cells could act retrogradely to modulate synaptic loss and thus maintain the firing properties of the lesioned cells. This is consistent with the actions of synaptotrophic factors, such as VEGF, which can alter the balance of inhibition to excitation.

Materials and Methods

Animals and surgical procedures. Experiments were performed on adult female cats weighing 2.0–2.5 kg obtained from authorized suppliers (Universidad de Córdoba, Córdoba, Spain). All procedures were in compliance with the guidelines of the European Union (2010/63/EU) and Spanish legislation (R.D. 53/2013 BOE 34/11370-421), and were authorized by the ethics committee of Universidad de Sevilla. Five animals were prepared for electrophysiological recordings and received either an axotomy of the MLF ($n = 1$) or an axotomy plus the implantation of neural progenitor cells ($n = 4$). Additional recordings from six control animals (unpublished data; Pastor and Gonzalez-Forero, 2003) and two axotomized animals (de la Cruz et al., 2000) were also used.

Six additional animals were used solely for histology, as follows: four animals for confocal fluorescence microscopy of the abducens nucleus and the MLF, which received the axotomy alone ($n = 2$) or the axotomy plus the implant ($n = 2$); and two of them, axotomized and implanted, were used for ultrastructural analysis of the lesion site in the MLF. Animals used for the morphological study were processed after a survival time of 2 months postlesion. No attempt was made to follow the time course and evolution of the implant in this study.

Animals were prepared for chronic recordings as previously described (Davis-López de Carrizosa et al., 2009). Briefly, animals received an injection of atropine sulfate (0.5 mg/kg, i.m.) to reduce vagal reflexes and were then anesthetized with ketamine hydrochloride (20 mg/kg, i.m.) mixed with xylazine (0.5 mg/kg, i.m.). They were implanted intracranially with bipolar stimulating electrodes at the exit of the abducens nerve and in the MLF to antidromically activate abducens motoneurons and interneurons, respectively (Fig. 1A). Coils were implanted in the sclera of both eyes to record ocular movements, and a pedestal was constructed to

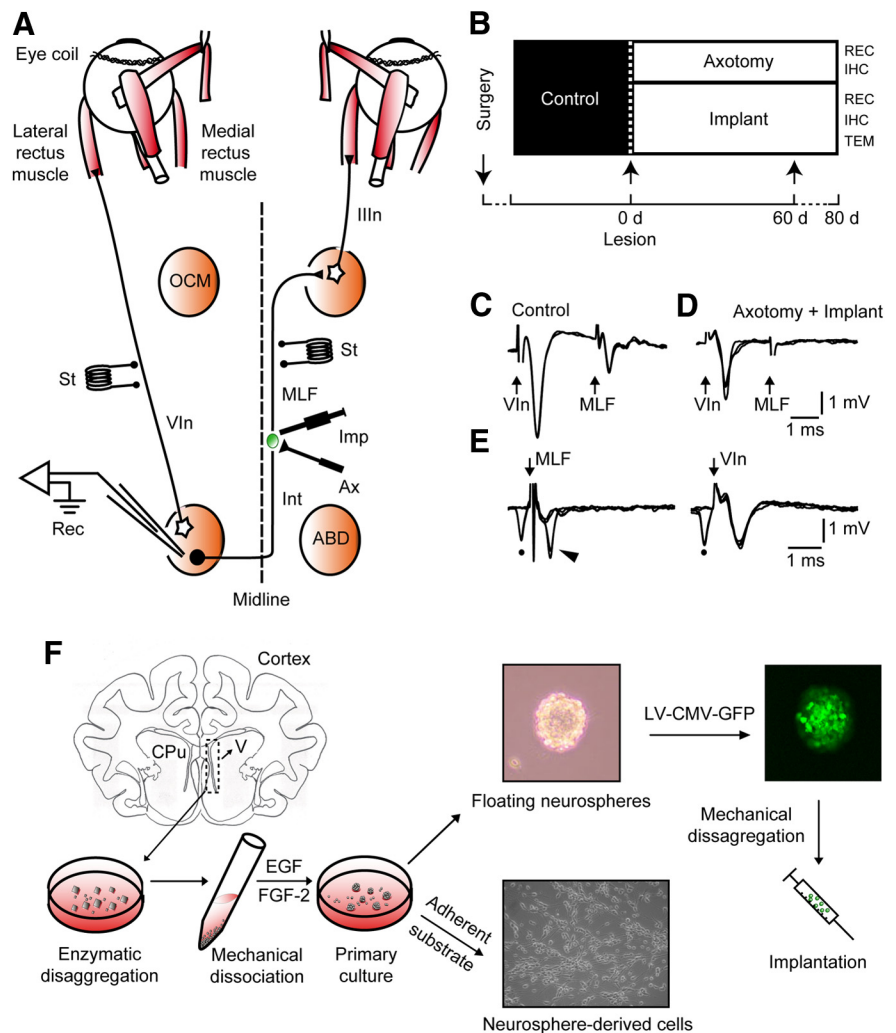


Figure 1. Experimental design and cellular identification. **A**, Diagram of connections of abducens (ABD) motoneurons and internuclear neurons (Int). Bipolar stimulating (St) electrodes were implanted in the VIn and in the MLF, respectively. The right MLF was sectioned (Ax) and implanted with neural progenitor cells (Imp). Recordings (Rec) were performed in the left ABD nucleus. **B**, Diagram of the time course of treatments and experimental procedures. IHC, Immunohistochemistry; REC, recordings; TEM, transmission electron microscopy. **C**, Antidromic field potentials obtained in ABD before lesioning by electrical stimulation of the VIn and MLF, respectively. **D**, Same as **C**, but after lesioning the MLF. **E**, Collision testing of an ABD Int. Left traces, Antidromic activation (arrowhead) of the Int from the MLF failed when conditioned by a prior spontaneous spike (dot). Right traces, Absence of collision of the orthodromic spike (dot) when the electrical shock was applied to the VIn. **F**, The subventricular zones were dissected aseptically from cat [postnatal day 3(P3) to P5] coronal sections at the lateral ventricle level (V), and enzymatically and mechanically disaggregated. The resulting cell suspension was cultured, and cells grew as floating neurospheres. On a poly-D-lysine adherent substrate, neurosphere-derived cells adhered to the dish and differentiated. Alternatively, neurospheres were transduced with lentiviral vectors containing a reporter gene for green fluorescent protein expressed under the control of a cytomegalovirus (CMV) promoter [lentiviral (LV)-CMV-GFP] and implanted in axotomized cats.

facilitate head-fixed extracellular recordings. Postoperative care was provided daily, as needed.

Extracellular recordings. Control recording sessions started ~10 d after surgery (Fig. 1B). Experimental sessions started 4 d after lesioning, and lasted for 75 d in the axotomy group and 77 d in the implanted group. The animal was gently placed inside a fabric bag, wrapped with elastic bandages, and positioned in a recumbent posture within a Plexiglas box, which was in turn placed inside the magnetic field for eye movement recording (Fuchs and Robinson, 1966). Procedures for extracellular recordings followed those described before (Davis-López de Carrizosa et al., 2009). The cellular electrophysiological identification proceeded as follows: the (left) abducens nucleus was located by recording the antidromic field potential produced by electrical stimulation of the VIn (Fig. 1C), in some cases aided by the antidromic field potential produced by the activation of abducens internuclear neurons after stim-

ulation of the MLF (Fig. 1C; MLF). Control abducens internuclear neurons were identified by their antidromic activation from the MLF, a collision test between the orthodromic and antidromic action potentials, and a lack of antidromic activity following VIth nerve stimulation (Fig. 1E, MLF). Axotomized abducens internuclear neurons were identified following the same criteria as previously described (de la Cruz et al., 2000): (1) the location within the limits of the antidromic field potential of the abducens nucleus induced following VIth nerve stimulation (Fig. 1C, VIn); (2) the failure of antidromic activation from the electrodes placed in the MLF and VIth nerve (Fig. 1D, MLF, E, VIn); and (3) the characteristic pattern of neuronal activity in relation to horizontal eye movements that will be described below.

Data storage and analysis. The horizontal and vertical eye positions (EPs) of both eyes and neuronal activity were digitally stored for off-line analysis (Power 1401, Cambridge Electronic Design). For data selection, computer programs written in Matlab 6.5 displayed instantaneous firing frequency and the positions of both eyes. Relationships between neuronal firing rate [FR; in spikes per second (sp/s)] and horizontal EP (in degrees) were obtained by linear regression analysis to calculate the slope (i.e., the neuronal sensitivity to eye position; k , in sp/s°), the ordinate intercept (F_0 , in sp/s), and the abscissa intercept [the recruitment threshold (Th), in degrees]. Firing rates during fixations were fitted to the equation $FR = k \times EP + F_0$. Relationships between neuronal firing and eye velocity (EV) during saccades were obtained by linear regression analysis after subtraction of the position component ($k \times EP$), which was calculated from the previously known sensitivity to eye position. Thus, the equation used was $FR - k \times EP = r \times EV + F_0$, where r (in sp/second per degree/second) is the neuronal sensitivity to EV (in degrees/second). For the separate calculation of the on and off components of k and r , the criterion was to sort fixations or saccades discriminating those that moved the eye in the on or in the off direction (Delgado-García et al., 1986a,b). It should be noted that fixations occurring after on-directed saccades that started and ended within the off hemifield were considered as on fixations, and vice versa. In the case of k -off and r -off, those fixations and saccades that silenced activity were excluded from the analysis. Due to the motor impairment of the eye ipsilateral to the MLF transection, we used the eye movement of the contralateral eye for computations.

Neural progenitor cell culture and viral transfection. To the best of our knowledge, this is the first report using neural progenitor cells obtained from the subventricular zone of newborn (3- to 5-d-old) cats. The material obtained from one kitten produced enough cells to implant two adult hosts. After decapitation and brain extraction, a thick slice containing the forebrain ventricles was placed in Leibovitz L-15 culture media (Invitrogen). The lateral walls of the lateral ventricles were dissected, chopped, and enzymatically dissociated with 2.5% trypsin for 15 min in DMEM mixed 1:1 with Ham's F-12 (DMEM/F-12; Invitrogen). After mechanical disaggregation with fire-polished Pasteur's pipettes, the material was centrifuged at 900 rpm, and the pellet was resuspended twice in DMEM/F-12 containing B-27 (Invitrogen), which was supplemented with 20 ng/ml epidermal growth factor (EGF; Invitrogen) and 10 ng/ml basic fibroblast growth factor (FGF-2; Millipore), and maintained with an atmosphere of 95% O_2 and 5% CO_2 , at 37°C. After 2–3 d, floating neurospheres were observed and then subcultured every 48–72 h until the moment of either transplantation or plating for *in vitro* differentiation (Fig. 1F). Before transplantation, neurospheres were prelabeled with either a fluorescent lipophilic tracer (PKH26; Sigma; Gudiño-Cabrera et al., 2000) or transfected overnight with a lentiviral vector containing a reporter gene for green fluorescent protein (GFP) expressed under the control of a cytomegalovirus promoter (titer, 10^7 pfu/ml) with a multiplicity of infection of 3. The virus-containing culture medium was removed and replaced with fresh DMEM/F12 supplemented with B-27, EGF, and FGF-2. After 48–72 h of incubation, neurosphere-derived cells were already expressing GFP and ready to be implanted. Before the cell implantation, neurospheres were mechanically disaggregated to generate a cell suspension. The viral vector yielded nearly complete labeling of the transfected neurosphere-derived cells, and allowed us to study their fine details with fluorescence and electron microscopes after implantation. The phenotype of these cells was not affected by the lentiviral transfection.

Transection of the MLF and injection of neural progenitor cells. Abducens internuclear axons cross the midline at the level of the abducens nucleus and then course toward the oculomotor complex. The transection of the MLF was performed stereotaxically using a microblade, as previously described (de la Cruz et al., 2000). Briefly, animals received a unilateral lesion of the MLF with a microblade of 2 mm width aimed stereotaxically toward the right MLF at the pontomesencephalic level (Pastor et al., 2000). Histology revealed lesions 0.5–1 mm caudal to the trochlear nucleus, that were confined to depths of 2–2.5 mm beneath the ventricular surface (Fig. 1A; see also Fig. 3A). Immediately after lesioning the MLF, the neural progenitor cells were injected through the tip (50 μm) of a micropipette connected to a Hamilton syringe using the same coordinates as for the lesion of the right MLF. Once at the calculated MLF depth, an ascending tract of 1 mm was made as 1 μl of the cell suspension containing ~50,000 cells was slowly ejected over a period of 1 min. The syringe was left in place for another minute and then gently removed.

Anterograde tracing. In the last recording session, two implanted animals received an electrophoretic injection of biotinylated dextran amine (BDA; Invitrogen) to reveal the fate of the severed axons of abducens internuclear neurons. Micropipettes with a tip diameter of 20–25 μm were filled with 3% BDA in Tris-HCl buffer (0.05 M), pH 7.4. Cathodal current pulses of 7 μA intensity (50% duty cycle) were applied for 20 min at three different locations within the abducens nucleus contralateral to the severed MLF. After 7 d, animals were perfused transcardially under deep anesthesia (sodium pentobarbital, 50 mg/kg, i.p.). The fixative was 4% paraformaldehyde in 0.1 M sodium phosphate buffer, pH 7.4. Brainstem parasagittal sections of 50 μm thickness were cut on a vibratome and collected in PBS, pH 7.4. BDA was revealed following overnight incubation in streptavidin-TRITC (1:500; Jackson ImmunoResearch) prepared in PBS with 0.1% Triton X-100 (PBS-T). After rinsing, sections were mounted on slides and prepared for immunofluorescence microscopy.

Immunohistochemical procedures for fluorescent confocal microscopy. Animals used for the immunohistochemical study were processed 2 months after the lesion (Fig. 1B). Coronal sections were cut on a Vibratome to a thickness of 50 μm . Sections containing the abducens nucleus were washed in PBS-T and, after blocking unspecific sites with 10% normal donkey serum in PBS-T for 1 h, were left overnight at room temperature in the primary antibody solution prepared in PBS-T with 5% normal donkey serum and 0.05% sodium azide. Double, occasionally triple, immunofluorescence labeling was undertaken for the following: calretinin (a marker for abducens internuclear neurons; de la Cruz et al., 1998), along with either synaptophysin (a general synaptic marker), vesicular GABA and glycine amino acid transporter (VGAT) for inhibitory synaptic boutons (González-Forero et al., 2004), or glial fibrillary acidic protein (GFAP) to identify astrocytes. The primary antibodies used were the following: calretinin [goat polyclonal antibody (pAb), 1:500; Swant], synaptophysin (mouse mAb, 1:2000; Millipore), VGAT (rabbit pAb, 1:500; Millipore), and GFAP (rabbit pAb, 1:500; DAKO). After washing, sections were incubated in a solution containing the appropriate fluorescently tagged secondary antibody for 2 h (prepared in PBS-T, 1:50–1:100; Jackson ImmunoResearch). After rinsing, sections were mounted on glass slides and coverslipped with Vectashield (Vector Laboratories). In addition, parasagittal sections through the lesion and implant site in the MLF were processed for GFAP, synaptophysin (as described above), or doublecortin (a marker of immature neurons) using as a primary antibody a goat anti-doublecortin antibody (1:100; sc-8066, Santa Cruz Biotechnology), followed by appropriate secondary antibodies.

A confocal microscope (TCS SP2, Leica) was used to capture 1024×1024 pixel images, and analysis was performed with ImageJ (NIH). Gray-scales were adjusted to maximize their dynamic range. Neurons were scanned in one to four different focal planes containing the nucleus along the z-axis (63 \times objective). The somatic coverage was measured and presented as the percentage ratio between the surface occupied by synaptophysin-immunoreactive boutons, VGAT-immunopositive terminals, or GFAP-immunostained profiles, and the perimeter of the calretinin-immunopositive somata of internuclear neurons (Pastor et al., 1997). The mean gray value in the neuropil stained for synaptophysin, VGAT, and GFAP was also measured using square boxes of 80 pixels per

side (25.8 μm), sampled through the neuropil of images captured with the 40 \times objective.

For VEGF immunocytochemistry of the implanted cells, the primary antibody used was a rabbit anti-VEGF (1:50; sc-507, Santa Cruz Biotechnology). For Flk1, the VEGF receptor visualized in abducens internuclear neurons, we used a mouse anti-Flk1 (1:1000; sc-6251, Santa Cruz Biotechnology), an antibody that selectively labels neurons (Ruiz de Almodovar et al., 2011), followed by calretinin immunolabeling (as described above) for the specific identification of abducens internuclear neurons.

Immunocytochemistry in neurosphere cultures. To analyze the ability of neurosphere-derived cells to generate the different neural lineages, they were seeded on poly-lysine-treated coverslips in DMEM/F-12 with 1% fetal calf serum for 4 h to facilitate adhesion and then in DMEM/F-12 with B-27, EGF, and FGF-2 added. After 48 h in the incubator, cells were fixed with 4% paraformaldehyde in PBS 0.1 M for 10 min. In other experiments, neurospheres were fixed immediately after the initial 4 h of adhesion to the substrate. Immunocytochemical processing included the following various double combinations of the following markers: β III-tubulin, a constituent protein of microtubules used to selectively discriminate neurons from glia (mouse mAb, 1:500; Promega); doublecortin, a microtubule-associated protein expressed almost exclusively by immature neurons (goat pAb, 1:500; Santa Cruz Biotechnology); GFAP, a marker of astrocytes (rabbit pAb, 1:500; DAKO); and NG-2 chondroitin sulfate proteoglycan, a marker of oligodendrocyte precursors (rabbit pAb, 1:400, Millipore). Secondary antibodies were all raised in donkey and tagged to different cyanine dyes as needed for color separation of the immunoreactions (1:200; Jackson ImmunoResearch). Incubation times were 2 h and 30 min for primary and secondary antibodies, respectively. Counterstaining with 4',6'-diamidino-2-phenylindole dihydrochloride (DAPI; 0.1 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 10 min incubation) was always performed after the immunocytochemical procedure. Fluorescence signals were detected and analyzed with a BX61 Olympus epifluorescence microscope.

In situ hybridization for detection of trophic factor mRNAs. *In situ* hybridization with oligonucleotide probes was performed in neonatal cat subventricular zone-derived neurospheres, as previously described (Morcuende et al., 2011), following the protocol of Wisden and Morris (2002). Oligonucleotide probes complementary to parts of mRNA encoding BDNF, NGF, NT-3, or VEGF were synthesized (Sigma-Genosys) and radiolabeled with α - ^{35}S -dATP (GE Healthcare) at the 3' end using terminal deoxyribonucleotidyl transferase (Promega). The specific activities of labeled probes ranged from 200,000 to 300,000 cpm/ μl . The following antisense DNA oligonucleotides were used: BDNF mRNA, 5'-CCA TGG GAT TAC ACT TGG TCT CGT AGA AAT ATT GCT TCA GTT GGC-3' (accession number NM_012513, bases 1190–1234; Maisonnier et al., 1991); NGF mRNA, 5'-TGC GGG CTC TGC GGA GGG CTG TGT CAA GGG AAT GCT GAA GTT TAG T-3' (accession number M36589, bases 401–446; Whittemore et al., 1988); NT-3 mRNA, 5'-TCA ATC CCC CTG CAA CCG TTT TTG ACT GGC CTG GCT TCT TTA CA-3' (accession number M34643, bases 658–701; Ernfors et al., 1990); VEGF mRNA: 5'-CAC ATC TGC AAG TAC GTT CGT TTA ACT CAA GCT GCC TCG CCT TGC-3' (accession number NM_001110336, bases 581–625; Conn et al., 1990). Although the nucleotide sequences for the cat neurotrophins or VEGF are not completely known, a GenBank search revealed that the sequences used here are highly conserved in rat, mouse, and human (Lein et al., 2000).

Neurospheres seeded on poly-lysine-coated glass slides in DMEM/F-12 medium with 1% fetal calf serum for 4 h were fixed for 5 min in 4% paraformaldehyde, progressively dehydrated, and stored in 95% ethanol. Slides that underwent *in situ* hybridization were air dried for 1–2 h. Cells were visualized and analyzed by bright-field microscopy (Axiophot microscope, Zeiss).

Electron microscopy processing. Two months postlesioning, animals were prepared for electron microscopy analysis (Fig. 1B). The intracardial perfusion consisted of a brief wash with physiological saline solution followed by a phosphate-buffered fixative containing 4% paraformaldehyde and 0.3% glutaraldehyde. The brainstem was removed and sectioned parasagittally at 100 μm by use of a vibratome. For the pre-embedding processing of GFP, sections selected for their green

fluorescence due to this marker (in neural progenitor cells, see above) were frozen and thawed three times using the vapors of liquid nitrogen for permeabilization purposes, and then a standard immunocytochemical technique was applied using overnight incubation in a primary anti-GFP antibody raised in mouse (1:2000; Millipore) followed by a 2 h incubation in a biotinylated anti-mouse antibody raised in goat (1:250; Vector Laboratories). Biotin was revealed according to the avidin–biotin–peroxidase complex method using 3,3'-diaminobenzidine tetrahydrochloride as the chromogen. Sections were postfixed in 1% osmium tetroxide for 2 h and stained en bloc with uranyl acetate, dehydrated and flat embedded in Durcupan ACM resin (Fluka). Ultrathin sections were examined with a transmission electron microscope (CM10, Philips).

The procedure for postembedding GFAP immunostaining of ultrathin sections was adapted from our previous protocol (de la Cruz et al., 1992). Ultrathin sections were incubated for 2 h in a rabbit anti-GFAP primary antibody (1:500; DAKO). The secondary antibody was a goat anti-rabbit IgG conjugated to gold colloidal particles of 10 nm (1:30, for 2 h; Sigma). A silver enhancement method for gold particles was applied before counterstaining with lead citrate and uranyl acetate (Danscher and Zimmer, 1978).

Statistics. Comparisons between groups were performed using one- or two-way ANOVA followed by *post hoc* pairwise multiple comparisons using the Holm–Sidak method at an overall significance level of 0.05 with the program SigmaPlot 11 (Systat Software GmbH.). Values were expressed as the mean \pm SD, unless otherwise specified.

Results

Multipotentiality of neural progenitor cells and graft–host interaction

This study shows that neural progenitor cells isolated from the postnatal cat subventricular zone can be amplified *in vitro*, are multipotent, and retain their ability to synthesize neurotrophic factors. Neural progenitor cells cultured as floating neurospheres differentiated into several lineages when subcultured on an adherent substrate. Thus, after 48 h *in vitro*, individual populations of adhered cells expressed the astrocytic marker GFAP (Fig. 2A), the neuronal marker β III-tubulin (Fig. 2B), doublecortin, as a marker of immature neurons, and/or NG-2 for oligodendrocyte precursors (data not shown). Even after only 4 h of adhesion to the substrate, some neurosphere-derived cells began to differentiate (Fig. 2C, labeled for NG-2). We also demonstrated by *in situ* hybridization that neurosphere-derived cells expressed the mRNAs of the trophic factors NGF, NT-3, and VEGF (Fig. 2D–F), but did not express BDNF mRNA (data not shown).

When implanted into the lesioned MLF (Fig. 3A), disaggregated neurospheres also yielded diverse phenotypes *in vivo*. The implant appeared 2 months after grafting as a mass of cells with rounded cell bodies that accumulated along the lesion tract (Fig. 3B–D). No attempt was made in this study to characterize the time course of the host–graft interaction. All morphological data presented here were obtained at 2 months postimplantation, which corresponded to the period in which we recorded the majority of cells. The immunoreaction against GFAP demonstrated the borders of the lesion (Fig. 3B). The implanted cells extended long, fine processes for distances of up to 500 μm (Fig. 3C,D). We found that 10.4% of the GFP-positive cells were immunoreactive for GFAP (Fig. 3E–G). Approximately 6% of the implanted cells were doublecortin immunoreactive (Fig. 3H–J). The neuronal marker β III-tubulin was detected in 5.5% of the implanted cells. A lower proportion of cells (2.6%) showed NG-2 immunolabeling, a marker for oligodendrocytic precursors (not illustrated). These results indicated moderately low levels of neural progenitor cell differentiation. The host–graft interaction was studied by means of anterograde BDA tracing from the contralateral abducens nucleus. The axons of lesioned abducens internuclear neu-

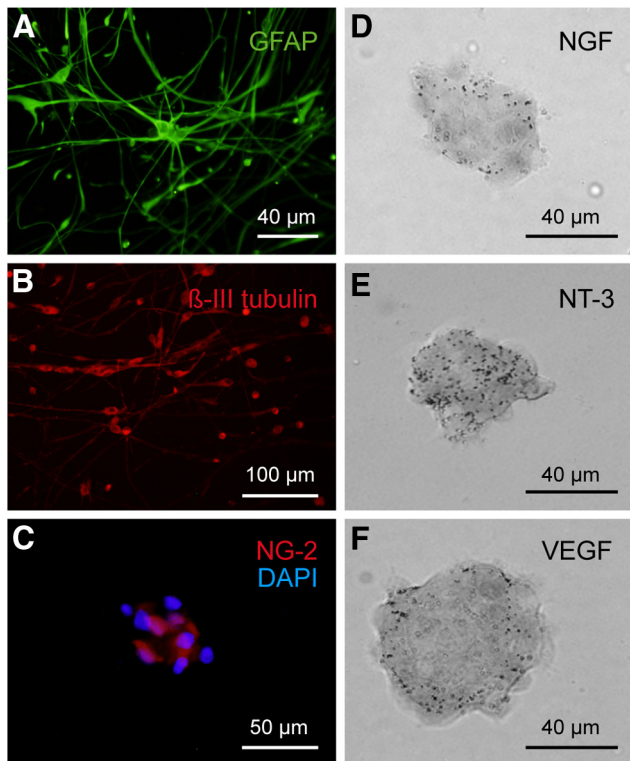


Figure 2. Phenotypic characterization of neural progenitor cells *in vitro*. **A–C**, Cells derived from neurospheres and cultured on a poly-D-lysine adherent substrate expressed markers of astrocytes (GFAP, green, **A**), neurons (β -III tubulin, red, **B**), and oligodendrocyte precursors (NG-2, **C**). In **C**, the NG-2 immunofluorescence (in red) is illustrated for a neurosphere and is accompanied by counterstaining with DAPI (in blue) to visualize the cell nuclei. **D–F**, *In situ* hybridization of mRNA in neurospheres derived from postnatal cats showing the expression of NGF (**D**), NT-3 (**E**), and VEGF (**F**).

rons showed close relationships with the implanted cells (Fig. 3K). In some instances, close appositions, reminiscent of synaptic contacts, were observed between axonal endings (labeled by synaptophysin) and implanted GFP-positive cells (Fig. 3L).

We evaluated the presence of VEGF in the implanted neural progenitor cells. For this purpose, we performed VEGF immunostaining in parasagittal brainstem sections taken through the lesion and implant site. Our data revealed that $\sim 68\%$ of the GFP-positive implanted cells were also VEGF immunoreactive (Fig. 3M). Moreover, we also analyzed, by double immunofluorescence, whether abducens internuclear neurons were endowed with the VEGF receptor Flk1. In the three experimental situations (control, axotomy, and postimplant), we found that all the calretinin-immunopositive cells in the abducens nucleus expressed the receptor Flk1 (Fig. 3N).

Neural progenitor cell implantation prevents axotomy-induced firing alterations in abducens internuclear neurons

Abducens neurons display tonic and phasic firing patterns during spontaneous horizontal eye fixations and saccades, respectively (Delgado-García et al., 1986b). Control abducens internuclear neurons showed a tonic regular discharge that correlated with eye position during eye fixations (Fig. 4A). Tonic firing rate increased proportional to the amplitude of eye rotations directed toward the side of recording, called the on-direction. By the same token, firing rate decreased proportional to eye positions aimed at the off-direction with respect to the recording site (Fig. 4A). Therefore, the slope of the linear regression analysis of firing rate versus

the eye position allowed the extraction of the neuronal eye position sensitivity (k ; measured in sp/seconds/degree; Fig. 4D,F, black lines and dots). The abscissa intercept of the firing rate-to-eye position plot is considered the eye position threshold at which the unit is recruited into activity (Fig. 4D, Th). The firing rate of the internuclear neurons was also correlated with eye velocity during saccades; thus, high-frequency bursts and pauses appeared during on-directed and off-directed saccades, respectively (Fig. 4A). The slope of the linear regression analysis between firing rate and eye velocity during saccades was considered the sensitivity to eye velocity, namely, r (Fig. 4E,G, black lines and dots).

The firing pattern of abducens internuclear neurons, but not that of abducens motoneurons, changed as soon as 4 d after MLF lesioning. This pattern remained altered for >2 months (de la Cruz et al., 2000; present data). Axotomized internuclear neurons had a drastic reduction in firing rate that disrupted the firing pattern (Fig. 4B). They showed a decline in modulation in relation to both eye position and velocity (Fig. 4D–G, red lines and dots). These alterations yielded lower k and threshold values ($p < 0.05$) during fixations compared with controls (Fig. 4D,F), as well as lower r values during saccades (Fig. 4E,G). Interestingly, a fundamental finding was that the implantation of neural progenitor cells in the MLF immediately after the lesioning prevented lesion-induced decay in both the k and r values (Fig. 4D–G, blue line and dots), and also maintained the normal firing pattern of internuclear neurons (Fig. 4C).

Compared with control cells ($n = 68$), axotomy alone caused a reduction in both eye position and eye velocity sensitivity shortly after the lesioning (4 d), and these values remained impaired throughout the entire experimental course. This indicated the absence of spontaneous recovery in the axotomy condition (Fig. 5A,B, red dots; $n = 57$). The average population data demonstrated a near halving of both eye position and eye velocity sensitivities (Fig. 5C,D, asterisks; $p < 0.05$), and a significant reduction in threshold (data not shown) as a consequence of the axotomy. Linear regression analysis of k or r values versus the recorded day showed no change in these parameters over time ($p > 0.05$) in the axotomy and postimplant groups. The implantation of neural progenitor cells maintained k values similar to control values from the onset of the experiment (Fig. 5A, blue dots; $n = 97$). The average k value after the implant was significantly different from the axotomy value, and similar to control values (Fig. 5C; $p < 0.05$). The same finding was also obtained regarding threshold (data not shown). With respect to eye velocity sensitivity, the implantation of neural progenitor cells produced only a partial re-establishment of this parameter (r). Thus, the mean r value in the postimplant group was significantly different from both the axotomy alone and control data (Fig. 5D, dot and asterisk; $p < 0.05$).

Alterations in the inhibition-to-excitation balance

To determine whether excitatory versus inhibitory firing signals were differentially recovered after neural progenitor cell implants, we independently measured the on and the off components of both eye position and velocity sensitivities as separate indexes of the excitation and the inhibition received by abducens neurons (Delgado-García et al., 1986a,b). The k -on component was measured as the slope of the regression line between firing rate and fixations that resulted after on-directed saccades. The opposite procedure was used to measure k -off components; that is, fixations attained after off-directed saccades were used, as illustrated for an internuclear neuron of each experimental group

(Fig. 5E). Similarly, saccades were sorted out into on-directed and off-directed saccades, and correlations were made separately (Fig. 5F). Axotomy reduced both the *k-on* and *k-off* values, and the implant elevated both parameters to normal levels when compared with the respective *k-on* or *k-off* values of the control group (Fig. 5G; $p < 0.05$). Therefore, with respect to the tonic signal, both the excitatory and the inhibitory components appeared similar to control values, revealing that the on/off synaptic drive during fixations (tonic firing) was balanced like that seen under the control situation. With respect to the phasic (saccadic) signal, axotomy also led to a reduction in both *r-on* and *r-off* parameters, compared with control *r-on* or *r-off* values, respectively (Fig. 5H). In contrast, *r-on* and *r-off* had different behaviors after neural progenitor cell implants. The *r-off* obtained in the postimplant group was similar to the control *r-off* value. However, the *r-on* component lay between that of the axotomy and the control *r-on* values (Fig. 5H; $p < 0.05$). These data indicated that whereas the inhibitory signal for off-directed saccades was completely re-established, the excitatory drive for on-directed saccades was only partially restored. These results point to an imbalance of the inhibitory-to-excitatory ratio caused by increased inhibition or a lack of excitation compared with controls.

Neural progenitor cell implants prevent synaptic stripping on abducens internuclear neurons

We sought to find a structural correlate of the functional alterations described above by investigating changes in the synaptology of abducens internuclear neurons. The somatic surface coverage of abducens internuclear neurons by synaptic boutons and astrocytic processes was measured by means of immunocytochemistry against synaptophysin and GFAP, respectively. To determine the ratio of inhibition to excitation, we measured the synaptic coverage of inhibitory boutons by using immunostaining against VGAT. In control abducens internuclear neurons, $60.5 \pm 8.0\%$ of the somatic perimeter was surrounded by synaptophysin-immunoreactive boutons (Fig. 6A,D; $n = 46$ cells), and $7.4 \pm 4.3\%$ was covered by astrocytic processes (Fig. 6I,L, Con; $n = 65$). The percentage of the somatic perimeter covered by inhibitory boutons (i.e., VGAT-immunoreactive boutons) was $34.6 \pm 7.1\%$ in controls (Fig. 6E,H, Con; $n = 47$). Axotomy significantly reduced the percentage of the somatic perimeter covered by synaptic boutons, which were identified as synaptophysin immunopositive, to $35.2 \pm 7.8\%$ (Fig. 6B,D, Ax; $n = 30$; $p < 0.05$). Axotomized neurons also showed a significant decrease in their

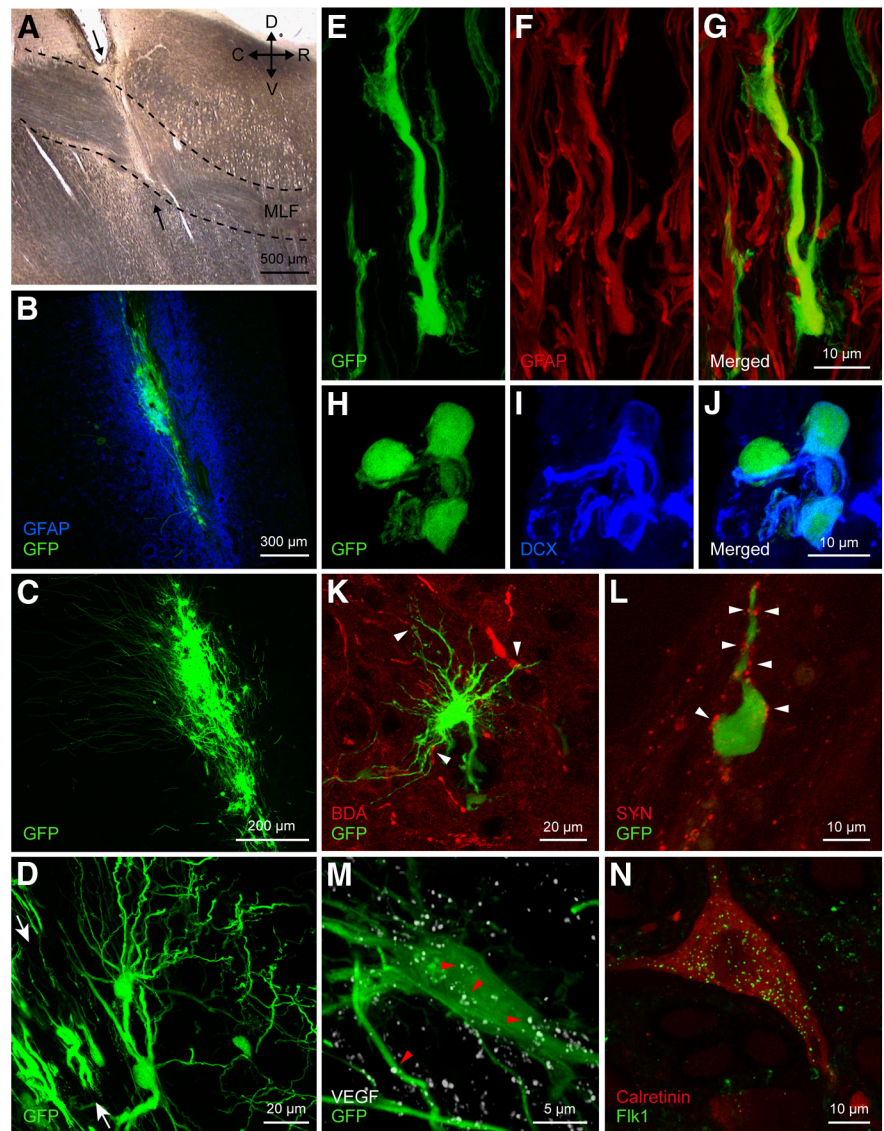


Figure 3. Implant–host interaction. **A**, Parasagittal section through the brainstem showing the transection (arrows) of the MLF (delimited by dashed lines). D, Dorsal; C, caudal; R, rostral; V, ventral. **B–D**, Confocal microscopic images of the implanted neural progenitor cells expressing GFP in the lesioned MLF. Note the presence of an intense astrocytic reaction around the lesion, as shown by GFAP immunostaining (**B**; blue), and the fine processes of the implanted cells (**C** and **D**). Arrows in **D** indicate the location of the lesion and implant tract. **E–G**, Some implanted, GFP-positive, neural progenitor cells differentiated into astrocytes (GFAP, red, **F**). **H–J**, Implanted cells could also differentiate into neurons, as demonstrated by doublecortin (DCX) immunoreactivity (blue), a marker of immature neurons. **K**, Example of the intimate association (arrowheads) between abducens internuclear axons (labeled anterogradely with BDA, in red) and an implanted neural progenitor cell (green). The image corresponds to a stack of 14 focal planes of $2 \mu\text{m}$ thickness. **L**, Synaptic boutons [identified as synaptophysin immunoreactive (SYN) in red] in close apposition (arrowheads) to the cell body and process of another identified implanted cell. **M**, Presence of VEGF in implanted neural progenitor cells. Note a GFP-positive implanted cell (in green) that was also VEGF immunoreactive (in white; arrowheads point to some immunoreactive dots). **N**, Example of an abducens internuclear neuron from an implanted animal, identified as calretinin immunopositive (in red), showing also immunostaining for the VEGF receptor Flk1 (in green). Images in **M** and **N** correspond to a stack of 13 and 7 focal planes of $0.8 \mu\text{m}$ thickness, respectively.

somatic coverage by boutons of an inhibitory nature, identified by their VGAT immunoreactivity, with respect to control (Fig. 6F,H, Ax; $n = 30$; $p < 0.05$). On the other hand, astrocytic processes proliferated to cover up to $12.3 \pm 7.2\%$ of the cell surface (Fig. 6J,L, Ax; $n = 42$; $p < 0.05$). The implantation of neural progenitor cells did not totally prevent the drop in synaptophysin-immunoreactive boutons covering axotomized internuclear neurons, as the extent of coverage was intermediate between the control and the axotomized states (Fig. 6C,D, Imp;

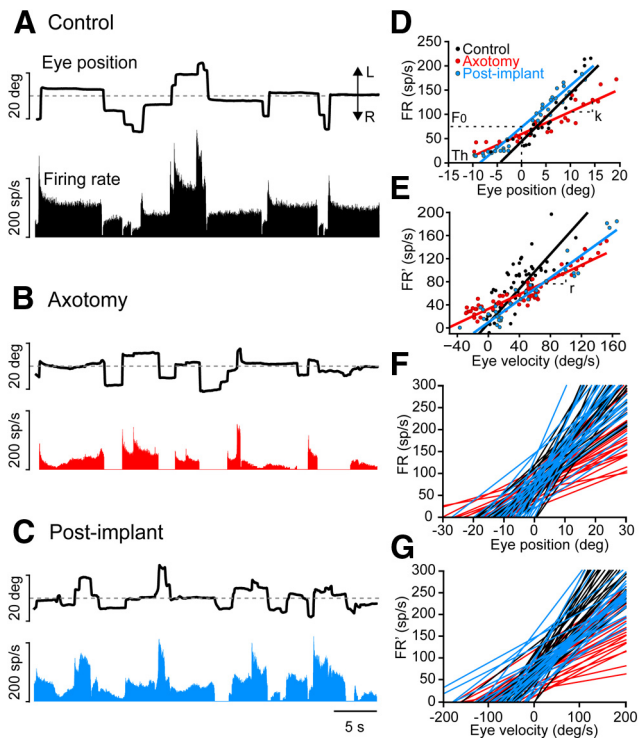


Figure 4. Effects of axotomy followed by a subventricular zone-derived neural progenitor implant on the firing pattern of abducens internuclear neurons. **A**, Firing rate (measured in spikes/s) of a control neuron during spontaneous eye movements [movements toward the left (L) and right (R) sides, respectively; deg, degrees]. **B**, Firing rate of an internuclear neuron 14 d after axotomy. Note that both tonic and phasic components of the firing pattern are reduced. **C**, Example of an abducens internuclear neuron recorded 14 d after the axotomy and implant, illustrating the presence of a firing pattern that resembled the control situation. **D**, Linear regression analysis between FR (spikes/s) and EP (degrees) for control (black), axotomized (14 d, red), and postimplant (15 d, blue) abducens internuclear neurons. The slope of the regression line (k) represents the neuronal eye position sensitivity, and F_0 is the firing rate at 0° . The recruitment Th is also indicated. **E**, Linear regression analysis between firing rate after subtracting the eye position component (FR' ; in spikes/second) and eye velocity (in degrees/second) for a control (black), axotomized (75 d, red), or postimplant (47 d, blue) abducens internuclear neuron. The slope of the regression line represents the neuronal eye velocity sensitivity (r). **F**, Rate–position plots illustrating the sensitivity to eye position in control (black), axotomized (red), and postimplant (blue) abducens internuclear neurons (25 cells per group). **G**, Rate–velocity plots illustrating the sensitivity to eye velocity in control (black), axotomized (red), and postimplant (blue) abducens internuclear neurons for the same set of cells, as in **F**.

$n = 51$). However, the VGAT coverage was maintained at values similar to control levels ($33.8 \pm 7.7\%$; Fig. 6G,H, Imp; $n = 35$), indicating that the cell implantation prevented the loss of inhibitory inputs induced by the axotomy. This is in agreement with the neurophysiological findings. The implant also prevented the increase in perisomatic GFAP induced by axotomy, as this value was similar to that of controls and was different from axotomy values (Fig. 6K,L, Imp; $n = 70$; $p < 0.05$ with respect to axotomy).

Optical density measurements of the coverage of synaptophysin, VGAT, and GFAP obtained from the neuropil of the abducens nucleus showed changes similar to those mentioned for the somata, except that the synaptophysin coverage was similar to that of controls in the implanted group (not illustrated).

Ultrastructural evidence of graft–host interaction

Neural progenitor cells were easily identified within and around the limits of the lesion by their GFP immunoreactivity (Fig. 7A, asterisk). Frequently, surrounding each GFP-positive cell body,

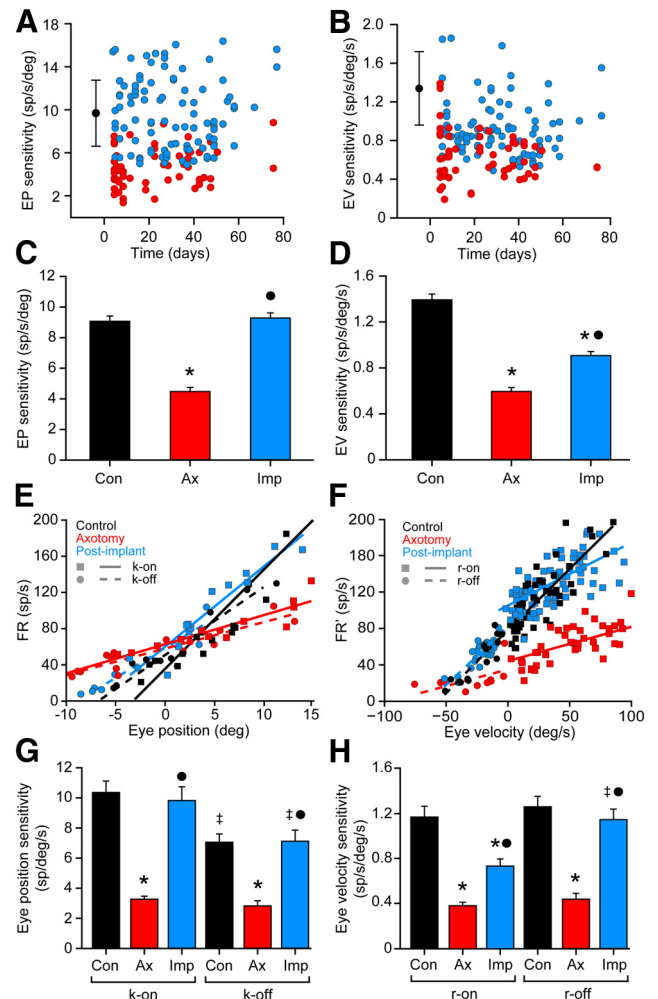


Figure 5. Analysis of the firing rate during spontaneous eye movements. **A**, Scatterplot of k values for axotomized (red) and postimplant (blue) abducens internuclear neurons represented versus time (days after the axotomy/implant). Control data are illustrated as a black dot (mean) with error bars (SD). **B**, Same as **A**, but for eye velocity sensitivity (r). **C**, **D**, Bar charts showing the mean \pm SEM values of eye position sensitivity (k ; **C**) and eye velocity sensitivity (r ; **D**) obtained from neurons of the three experimental conditions: control ($n = 68$), axotomy ($n = 57$), and postimplant ($n = 97$). Significant differences with respect to control and axotomy groups are indicated by * and \bullet , respectively ($p < 0.05$; ANOVA test, Holm–Sidak method for multiple comparisons). **E**, Regression lines of FR versus eye position sorting those fixations attained after on-directed saccades (solid lines; k -on) from those after off-directed saccades (dashed lines; k -off) for an internuclear neuron of each group. **F**, Regression lines obtained after plotting the firing rate [minus the eye position component (FR')] versus the eye velocity during on-directed (solid lines; r -on) or off-directed saccades (dashed lines; r -off) for an internuclear neuron of each group. **G**, **H**, Bar charts showing the on/off values (mean \pm SEM) of eye position (**G**) and velocity (**H**) sensitivity, for 20 cells from each experimental population. Significant differences with respect to the control and axotomy groups for each parameter are shown by * and \bullet , respectively, while † represents significant differences between the on and off parameters within the same group ($p < 0.05$; two-way ANOVA test, Holm–Sidak method for multiple comparisons).

there was a field of smaller labeled elements interacting in a variety of ways with other, nonlabeled, elements at the lesion site (Fig. 7A, arrows). Astrocytes were identified by the presence of postembedding Immunogold GFAP labeling over the bundles of intermediate filaments (Fig. 7B, arrows, inset). Close appositions of implanted cell profiles with astrocytic elements were common (Fig. 7C, framed region), and, sometimes, extensive appositions to the cell membranes of microglial-like cells were observed (Fig. 7C,D). Within the MLF, immediately caudal to the lesion site, it was possible to find close relations between

implanted cells and axonal elements. Axons lay in close proximity to GFP-labeled elements (Fig. 7E) that presumably were the result of long, fine extensions of the implanted cells observed with a light microscope. In some instances, it was possible to identify a postsynaptic density on the membrane of an implanted cell. Even in cases where the darkened cytoplasm from the GFP immunolabeling precluded observing postsynaptic densities, these terminal associations were considered to be indicative of a synaptic contact due to the clustering of synaptic vesicles in the presynaptic element (Fig. 7F). In all cases, synaptic vesicles were of the spherical type, like those of abducens internuclear neuron terminals contacting their natural or even novel targets (de la Cruz et al., 2002). On the other hand, we also observed a few enlarged axonal endings that resembled the terminal clubs previously described in axotomized abducens internuclear neurons. These lacked any postsynaptic elements (data not shown; see Pastor et al., 2000).

Discussion

In the present work, we have shown that neural progenitor cells derived from the postnatal cat subventricular zone interact with the host lesioned CNS after grafting, and largely prevent alterations in the discharge pattern and in synaptic connectivity induced by central axotomy. Neural progenitor cells are a source of neurotrophic factors and may act as a novel postsynaptic target for the lesioned host neurons. Therefore, we suggest that factors derived from the implanted cells likely play an important role in the re-establishment, to a great extent, of the normal modes of firing and synaptic connectivity in axotomized abducens internuclear neurons.

Acute implantation of cells immediately after lesioning has been shown to be the appropriate method for transplantation-based therapies, since it reduces the secondary tissue damage produced by activated macrophages, while promoting healing (Cusimano et al., 2012). Our strategy was exactly this, as we implanted cells at the lesion site in a single surgical session and in accordance with our previous studies (Pastor et al., 2000; Benítez-Temiño et al., 2005). Moreover, neural progenitor cells isolated from the subventricular germinal zone of kittens could be amplified *in vitro* as neurospheres, and retained multipotentiality both *in vitro* and *in vivo*. The ability to differentiate into cells of different lineages (Reynolds and Weiss, 1992; Lois and Alvarez-Buylla, 1993) indicates a promising therapeutic strategy for restoring function by means of integration and re-establishment of connectivity across the lesion site (Bonner et al., 2011), and by molecular transmittal of signals between host and graft (Li et al., 2006; Tonchev et al., 2007). In our model, we demonstrated the interaction of host axons with grafted cells. Unfortunately, the development of a strategy that promotes crossing of the lesion site by sprouting axons remains to be achieved.

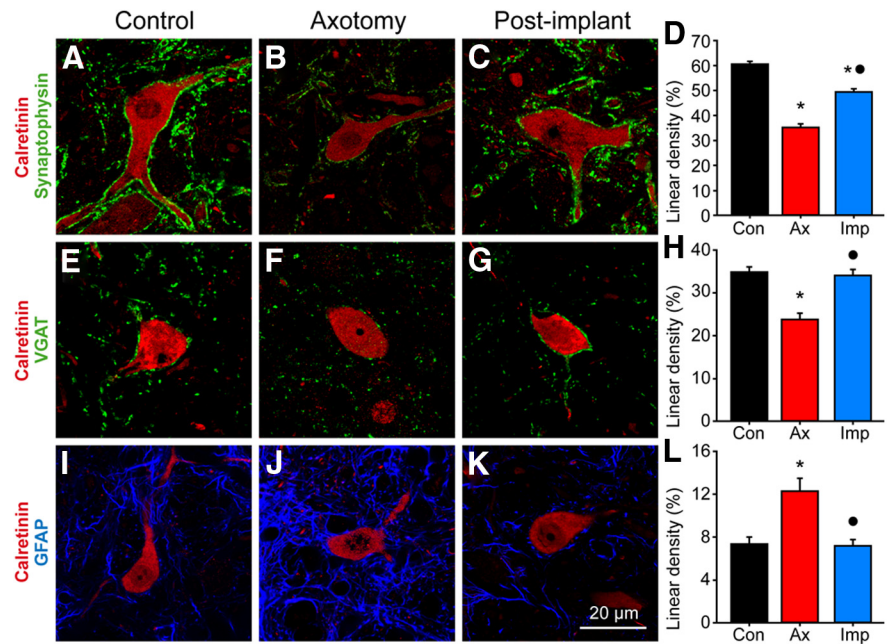


Figure 6. Effects of neural progenitor cell implants on synaptic and astrocytic somatic coverage. **A–C**, Confocal microscopy images of abducens internuclear neurons (identified by calretinin immunoreactivity, in red) and synaptophysin-immunoreactive boutons (in green) over the cell body of a control neuron (**A**), an axotomized neuron (**B**), and another axotomized neuron, but from an animal that received a neural progenitor cell implant (**C**). **D**, Bar chart showing the percentage of the somatic perimeter covered by synaptophysin-immunoreactive boutons (i.e., linear density; mean \pm SEM) of abducens internuclear neurons in the different experimental conditions: control ($n = 46$ cells), axotomy ($n = 30$ cells) and postimplant ($n = 51$ cells). Significant differences with respect to the control (*) and axotomy (•) groups are indicated ($p < 0.05$; ANOVA test, Holm–Sidak method for multiple comparisons). **E–G**, Same as above, but for inhibitory boutons labeled with the antibody against VGAT. **H**, Bar chart as in **D** showing the linear density of VGAT somatic coverage for 47 control cells, 30 axotomized cells, and 35 postimplant cells. **I–K**, Same as above, but for astrocytic filaments (labeled by immunofluorescence against GFAP, in blue) around abducens internuclear somata. **L**, Bar chart as in **D** and **H**, but for the linear density of GFAP-immunoreactive somatic appositions for 65 control, 42 axotomized, and 70 postimplant cells.

Neural progenitor cells as a source of trophic support for lesioned cells

Progenitor cells of the subventricular zone express different growth factors, such as NGF, BDNF, NT-3, or VEGF, in their neurogenic niche, as well as when amplified *in vitro* (Maurer et al., 2003; Tonchev et al., 2007; also our results). They have been useful for the re-establishment of alterations produced by a variety of neuronal lesions (Oka et al., 2004; Fagerlund et al., 2012). Since abducens neurons are endowed with the high-affinity receptors for neurotrophins trkA, trkB, and trkC (Benítez-Temiño et al., 2004), they can retrogradely transport these factors from implanted cells. However, the involvement of these specific neurotrophins in mediating the beneficial effects of these grafts on axotomized abducens internuclear neurons is unlikely. The reason for this is that the firing properties observed in these cells after the implant differed remarkably from those described in the axotomized motoneurons of the same nucleus after the exogenous administration of BDNF, NT-3, or NGF (Davis-López de Carizosa et al., 2009, 2010). Given that abducens motoneurons and internuclear neurons share similar discharge characteristics and afferent inputs (Delgado-García et al., 1986a,b), they presumably respond similarly to neurotrophins. For example, BDNF and NT-3 produce complementary, albeit differential, effects on the firing and synaptology of axotomized abducens motoneurons. NT-3 produces the re-establishment of the phasic component of firing rate in relation to saccades, whereas BDNF induces restoration of the tonic firing during fixations (Davis-López de Carizosa et al., 2009). Another neurotrophin with powerful

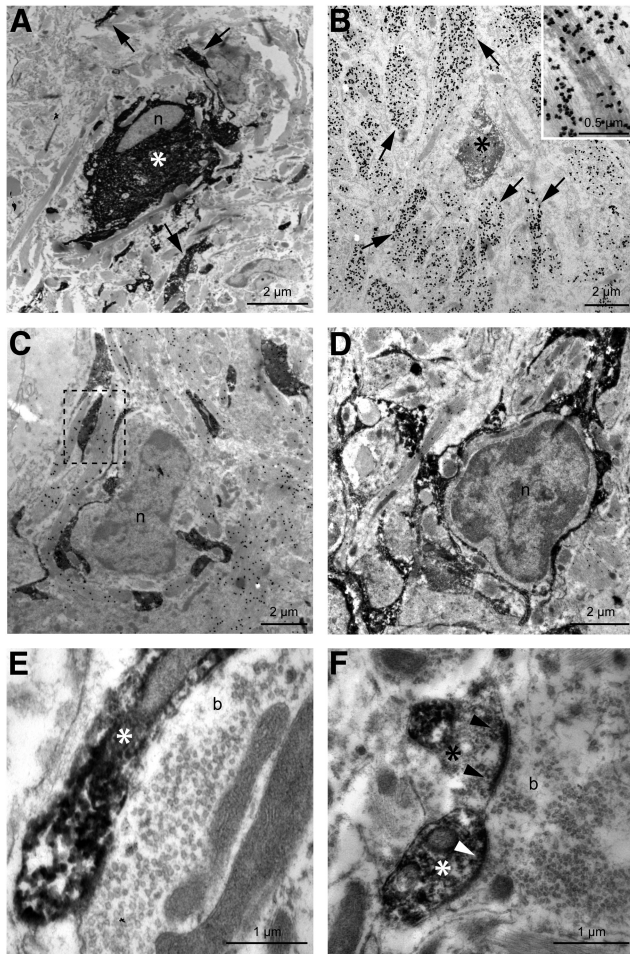


Figure 7. Electron microscopic images showing implanted neural progenitor cells and their relationship with the host tissue. **A**, Soma of a GFP-immunostained neural progenitor cell (*); *n* indicates the cell nucleus. Note other GFP-identified processes in the neuropil (arrows). **B**, A GFP-immunoreactive element derived from an implanted cell (*) surrounded by GFAP-immunostained profiles (arrows). The inset shows at a higher magnification the labeling with immunogold particles of the astrocytic intermediate filaments. **C, D**, Electron-dense GFP-immunoreactive processes from implanted cells in close apposition to presumptive microglial cells. Note that a thin cytoplasm enveloped the nuclei of the two microglial cells (*n*, **C** and **D**). GFAP immunogold labeling revealed the close proximity between host astrocytic processes and implanted elements (e.g., see the framed region in **C**). **E, F**, Synaptic boutons (*b*) in contact with GFP-immunoreactive profiles (*). Note the postsynaptic densities in the elements derived from implanted neural progenitor cells (**F**, arrowheads) along with the clustering of synaptic vesicles in the presynaptic terminal, indicative of synaptic contact between host boutons and implanted cells.

synaptotrophic actions on the oculomotor system is NGF. It regulates both the tonic and phasic components of firing (Davis-López de Carrizosa et al., 2010), but, unlike the present data, it produces a significant increase in *k* and *r* values relative to control. Remarkably, neurotrophin-mediated specification of electrophysiological properties has also been found in other systems (Adamson et al., 2002; Zhou et al., 2005; Salama-Cohen et al., 2006).

The physiological response of axotomized abducens internuclear neurons to the implantation of neural progenitor cells was characterized by a complete normalization of the inhibitory eye-related signals, but only a partial maintenance of the excitatory signals (*r-on* signals). These findings led us to investigate the possibility that implanted cells contained VEGF, since this factor has been shown to induce a depression in excitatory synaptic

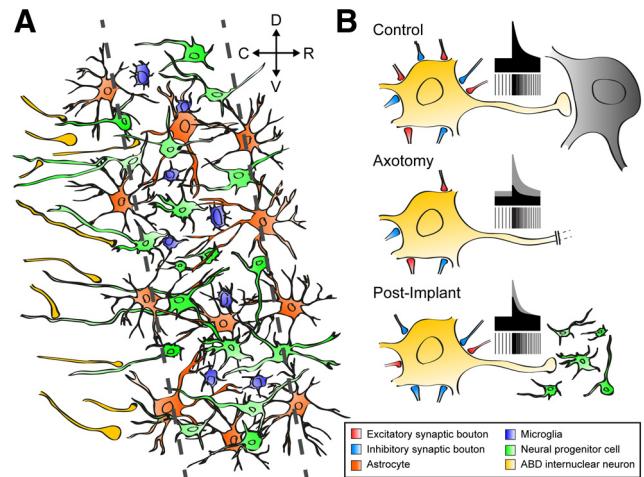


Figure 8. **A, B**, Schematic drawing summarizing the interactions between implanted neural progenitor cells and the host (**A**) as well as the physiological response of abducens internuclear neurons (**B**). **A**, Scaffold of implanted cells (green) interacting with microglia (blue) and astrocytes (orange). Some sectioned axons in the MLF (yellow) established synaptic contacts with processes originating from implanted cells. D, Dorsal; C, caudal; R, rostral; V, ventral. **B**, The discharge characteristics and synaptic inputs of abducens internuclear neurons are illustrated. Control cells showed a balance of excitatory to inhibitory synaptic drives, which produced their typical tonic–phasic firing. Axotomy led to the loss of both excitatory and inhibitory boutons in similar proportions, resulting in a decrease in tonic and phasic signals. However, after the implant, axotomized abducens internuclear neurons completely recovered the tonic signals, whereas the re-establishment of the phasic signals was partial and paralleled a synaptic imbalance in favor of inhibition.

transmission in several neuronal types (McCloskey et al., 2005, 2008). Immunostaining demonstrated that 68% of GFP-positive cells in implanted animals were also VEGF immunoreactive and that the VEGF receptor Flk1 was also present in abducens internuclear neurons. VEGF was discovered as an angiogenic factor, but recent evidence indicates that it also acts as a neurotrophic and neuroprotective agent (Storkebaum et al., 2005; Zachary, 2005; Tolosa et al., 2008; Tovar-Y-Romo and Tapia, 2010). VEGF treatment reduces both astrogliosis and the loss of neuromuscular junctions (Sathasivam, 2008). Moreover, microarray analysis in VEGF-deficient mice shows a downregulation of axonal growth and synapse formation genes (Brockington et al., 2010). Consistent with this, we observed signs of interaction between implanted and host cells, including the establishment of synaptic contacts by MLF axons on neural progenitor cells. Thus, trophic support of lesioned neurons could be delivered retrogradely following uptake by their axonal contacts (Fig. 8A, summary of the host–graft interactions at the lesion site).

Changes in excitatory and inhibitory inputs to abducens internuclear neurons

We have recently shown, *in vivo*, that neurotrophins are involved in the restoration of diverse components of the firing properties of axotomized motoneurons, and that they exert a potent synaptotrophic action over inputs to motoneurons (Davis-López de Carrizosa et al., 2009, 2010). Those findings demonstrated that firing properties are restored in accordance with the re-establishment of synaptic afferent innervation. It is well known that axotomy induces synaptic denervation and that the intensity of reinnervation is related to the availability of target tissue (Sumner, 1975; de la Cruz et al., 1996). Nonetheless, two major findings here indicate that an imbalance between excitation and inhibition occurred in the axotomized neurons of animals im-

planted with neural progenitor cells. First, the partial improvement of the *r-on* component of firing (the neuronal eye velocity sensitivity for on-directed saccades), in contrast to the complete restoration of the *r-off* component (Fig. 8B, schematic illustration). This implies that the synaptic drive coming from the excitatory reticular burst neurons (responsible for the on-signal) was only partially restored, in contrast to the complete re-establishment of the afferent input from inhibitory reticular burst neurons (Hikosaka et al., 1978; Igusa et al., 1980; Büttner and Büttner-Ennever, 2006). Second, and in agreement with the physiological data, we found a partial re-establishment of synaptophysin coverage (i.e., excitatory plus inhibitory inputs) at the somatic level, whereas the somatic VGAT coverage (only inhibitory synapses) was similar to control values (Fig. 8B, synaptic boutons). In interpreting this, it is important to consider that reticular neurons terminate preferentially over the soma and proximal dendrites of abducens neurons (Escudero and Delgado-García, 1988).

On the other hand, the improvement of the tonic firing in abducens internuclear neurons from implanted animals was complete, since *k* values—including both *k-on* and *k-off*—were similar to their respective control values after grafting. This indicates that the excitatory-to-inhibitory balance of tonic inputs was similar to that of controls. Considering that the tonic input (originating in the prepositus hypoglossi nucleus) terminates preferentially on distal dendrites (Escudero and Delgado-García, 1988), it is noteworthy that the confocal analysis showed normal synaptophysin and VGAT immunoreactivity at the abducens neuropil level.

Two trophic molecules have recently been shown to alter the inhibitory-to-excitatory balance in the direction presented here. NGF effects have been demonstrated for hippocampal neurons (Salama-Cohen et al., 2006) and abducens motoneurons (Davis-López de Carrizosa et al., 2010), although other changes have also been described in the latter case (i.e., *k* and *r* values higher than control values), which were not observed in the present recordings. VEGF has also been shown to alter synaptic and ionic properties of neurons in the direction observed in our data. The synaptic amplitude after Schaffer collateral stimulation in hippocampal neurons or the hypoglossal excitatory responses to solitary tract nucleus stimulation are decreased by VEGF (McCloskey et al., 2005, 2008). The reported depression of excitatory synaptic transmission produced by VEGF could be a form of compensatory plasticity aimed at reducing activity in the epileptic brain (McCloskey et al., 2005). VEGF acts as a pleiotrophic factor on different types of neuronal and glial cells, it fosters neurogenesis and vasculogenesis, and it is axonally transported (Storkebaum et al., 2005). Using the same model, we have previously demonstrated in adult rats that VEGF content in axotomized abducens internuclear neurons increases significantly following neural progenitor cell implants (Talaverón et al., 2013). Thus, although the involvement of other neurotrophic molecules cannot be discarded, our data point to VEGF as a relevant factor mediating the re-establishment of the discharge characteristics in axotomized abducens internuclear neurons, and as a synaptotrophic molecule capable of inducing long-term modifications in the synaptic complement.

In conclusion, the fact that neural progenitor cell implants cause the firing and synaptic properties of injured neurons to depart from the axotomy state and move toward their normal operational mode strongly encourages the use of these cells as a useful tool for inducing functional improvement following trauma or neurological disorders.

References

- Adamson CL, Reid MA, Davis RL (2002) Opposite action of brain-derived neurotrophic factor and neurotrophin-3 on firing features and ion channel composition of murine spiral ganglion neurons. *J Neurosci* 22:1385–1396. [Medline](#)
- Benítez-Temiño B, Morcuende S, Mentis GZ, de la Cruz RR, Pastor AM (2004) Expression of Trk receptors in the oculomotor system of the adult cat. *J Comp Neurol* 473:538–552. [CrossRef Medline](#)
- Benítez-Temiño B, de la Cruz RR, Tena JJ, Pastor AM (2005) Cerebellar grafting in the oculomotor system as a model to study target influence on adult neurons. *Brain Res Brain Res Rev* 49:317–329. [CrossRef Medline](#)
- Bonner JF, Connors TM, Silverman WF, Kowalski DP, Lemay MA, Fischer I (2011) Grafted neural progenitors integrate and restore synaptic connectivity across the injured spinal cord. *J Neurosci* 31:4675–4686. [CrossRef Medline](#)
- Boyce VS, Park J, Gage FH, Mendell LM (2012) Differential effects of brain-derived neurotrophic factor and neurotrophin-3 on hindlimb function in paraplegic rats. *Eur J Neurosci* 35:221–232. [CrossRef Medline](#)
- Brockington A, Heath PR, Holden H, Kasher P, Bender FL, Claes F, Lambrechts D, Sendtner M, Carmeliet P, Shaw PJ (2010) Downregulation of genes with a function in axon outgrowth and synapse formation in motor neurons of the VEGFdelta/delta mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. *BMC Genomics* 11:203. [CrossRef Medline](#)
- Büttner U, Büttner-Ennever JA (2006) Present concepts of oculomotor organization. In: *Neuroanatomy of the oculomotor system* (Büttner-Ennever JA, ed.), pp 1–42. Amsterdam: Elsevier.
- Chao MV (2003) Neurotrophins and their receptors: a convergence point for many pathways. *Nat Rev Neurosci* 4:299–309. [CrossRef Medline](#)
- Conn G, Bayne ML, Soderman DD, Kwok PW, Sullivan KA, Palisi TM, Hope DA, Thomas KA (1990) Amino acid and cDNA sequences of a vascular endothelial cell mitogen that is homologous to platelet-derived growth factor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 87:2628–2632. [CrossRef Medline](#)
- Cusimano M, Bizziato D, Brambilla E, Donegà M, Alfaro-Cervello C, Snider S, Salani G, Pucci F, Comi G, García-Verdugo JM, De Palma M, Martino G, Pluchino S (2012) Transplanted neural stem/precursor cells instruct phagocytes and reduce secondary tissue damage in the injured spinal cord. *Brain* 135:447–460. [CrossRef Medline](#)
- Danscher G, Zimmer J (1978) An improved Timm-sulphide method for light and electron microscopic localization of heavy metals in biological tissues. *Histochemistry* 55:27–40. [CrossRef Medline](#)
- Davis-López de Carrizosa MA, Morado-Díaz CJ, Tena JJ, Benítez-Temiño B, Pecero ML, Morcuende SR, de la Cruz RR, Pastor AM (2009) Complementary actions of BDNF and neurotrophin-3 on the firing patterns and synaptic composition of motoneurons. *J Neurosci* 29:575–587. [CrossRef Medline](#)
- Davis-López de Carrizosa MA, Morado-Díaz CJ, Morcuende S, de la Cruz RR, Pastor AM (2010) Nerve growth factor regulates the firing patterns and synaptic composition of motoneurons. *J Neurosci* 30:8308–8319. [CrossRef Medline](#)
- Davis-López de Carrizosa MA, Morado-Díaz CJ, Miller JM, de la Cruz RR, Pastor AM (2011) Dual encoding of muscle tension and eye position by abducens motoneurons. *J Neurosci* 31:2271–2279. [CrossRef Medline](#)
- de la Cruz RR, Pastor AM, Martínez-Guijarro FJ, López-García C, Delgado-García JM (1992) Role of GABA in the extraocular motor nuclei of the cat: a postembedding immunocytochemical study. *Neuroscience* 51:911–929. [CrossRef Medline](#)
- de la Cruz RR, Pastor AM, Delgado-García JM (1996) Influence of the postsynaptic target on the functional properties of neurons in the adult mammalian central nervous system. *Rev Neurosci* 7:115–149. [Medline](#)
- de la Cruz RR, Pastor AM, Martínez-Guijarro FJ, López-García C, Delgado-García JM (1998) Localization of parvalbumin, calretinin, and calbindin D-28k in identified extraocular motoneurons and internuclear neurons of the cat. *J Comp Neurol* 390:377–391. [CrossRef Medline](#)
- de la Cruz RR, Delgado-García JM, Pastor AM (2000) Discharge characteristics of axotomized abducens internuclear neurons in the adult cat. *J Comp Neurol* 427:391–404. [CrossRef Medline](#)
- de la Cruz RR, Benítez-Temiño B, Pastor AM (2002) Intrinsic determinants of synaptic phenotype: an experimental study of abducens internuclear neurons connecting with anomalous targets. *Neuroscience* 112:759–771. [CrossRef Medline](#)
- Delgado-García JM, del Pozo F, Baker R (1986a) Behavior of neurons in the

- abducens nucleus of the alert cat-I. Motoneurons. *Neuroscience* 17:929–952. [CrossRef Medline](#)
- Delgado-García JM, del Pozo F, Baker R (1986b) Behavior of neurons in the abducens nucleus of the alert cat-II. Internuclear neurons. *Neuroscience* 17:953–973. [CrossRef Medline](#)
- Ernfors P, Ibáñez CF, Ebendal T, Olson L, Persson H (1990) Molecular cloning and neurotrophic activities of a protein with structural similarities to nerve growth factor: developmental and topographical expression in the brain. *Proc Natl Acad Sci U S A* 87:5454–5458. [CrossRef Medline](#)
- Escudero M, Delgado-García JM (1988) Behavior of reticular, vestibular and prepositus neurons terminating in the abducens nucleus of the alert cat. *Exp Brain Res* 71:218–222. [Medline](#)
- Fagerlund M, Pérez Estrada C, Jaff N, Svensson M, Brundin L (2012) Neural stem/progenitor cells transplanted to the hypoglossal nucleus integrates with the host CNS in adult rats and promotes motor neuron survival. *Cell Transplant* 21:739–747. [CrossRef Medline](#)
- Fuchs AF, Robinson DA (1966) A method for measuring horizontal and vertical eye movement chronically in the monkey. *J Appl Physiol* 21:1068–1070. [Medline](#)
- González-Forero D, Pastor AM, Delgado-García JM, de la Cruz RR, Alvarez FJ (2004) Synaptic structural modification following changes in activity induced by tetanus neurotoxin in cat abducens neurons. *J Comp Neurol* 471:201–218. [CrossRef Medline](#)
- Gudiño-Cabrera G, Pastor AM, de la Cruz RR, Delgado-García JM, Nieto-Sampedro M (2000) Limits to the capacity of transplants of olfactory glia to promote axonal regrowth in the CNS. *Neuroreport* 11:467–471. [CrossRef Medline](#)
- Hikosaka O, Igusa Y, Nakao S, Shimazu H (1978) Direct inhibitory synaptic linkage of pontomedullary reticular burst neurons with abducens motoneurons in the cat. *Exp Brain Res* 33:337–352. [Medline](#)
- Igusa A, Sasaki S, Shimazu H (1980) Excitatory premotor burst neurons in the cat pontine reticular formation related to the quick phase of vestibular nystagmus. *Brain Res* 182:451–456. [CrossRef Medline](#)
- Lein ES, Hohn A, Shatz CJ (2000) Dynamic regulation of BDNF and NT-3 expression during visual system development. *J Comp Neurol* 420:1–18. [CrossRef Medline](#)
- Li J, Imitola J, Snyder EY, Sidman RL (2006) Neural stem cells rescue nervous Purkinje neurons by restoring molecular homeostasis of tissue plasminogen activator and downstream targets. *J Neurosci* 26:7839–7848. [CrossRef Medline](#)
- Lois C, Alvarez-Buylla A (1993) Proliferating subventricular zone cells in the adult mammalian forebrain can differentiate into neurons and glia. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90:2074–2077. [CrossRef Medline](#)
- Maisonpierre PC, Le Beau MM, Espinosa R 3rd, Ip NY, Belluscio L, de la Monte SM, Squinto S, Furth ME, Yancopoulos GD (1991) Human and rat brain-derived neurotrophic factor and neurotrophin-3: gene structures, distributions, and chromosomal localizations. *Genomics* 10:558–568. [CrossRef Medline](#)
- Maurer MH, Tripps WK, Feldmann RE Jr, Kuschinsky W (2003) Expression of vascular endothelial growth factor and its receptors in rat neural stem cells. *Neurosci Lett* 344:165–168. [CrossRef Medline](#)
- McCloskey DP, Croll SD, Scharfman HE (2005) Depression of synaptic transmission by vascular endothelial growth factor in adult rat hippocampus and evidence for increased efficacy after chronic seizures. *J Neurosci* 25:8889–8897. [CrossRef Medline](#)
- McCloskey DP, Hintz TM, Scharfman HE (2008) Modulation of vascular endothelial growth factor (VEGF) expression in motor neurons and its electrophysiological effects. *Brain Res Bull* 76:36–44. [CrossRef Medline](#)
- Morcuende S, Matarredona ER, Benítez-Temiño B, Muñoz-Hernández R, Pastor AM, de la Cruz RR (2011) Differential regulation of the expression of neurotrophin receptors in rat extraocular motoneurons after lesion. *J Comp Neurol* 519:2335–2352. [CrossRef Medline](#)
- Navarro X, Vivó M, Valero-Cabré A (2007) Neural plasticity after peripheral nerve injury and regeneration. *Prog Neurobiol* 82:163–201. [CrossRef Medline](#)
- Oka S, Honmou O, Akiyama Y, Sasaki M, Houkin K, Hashi K, Kocsis JD (2004) Autologous transplantation of expanded neural precursor cells into the demyelinated monkey spinal cord. *Brain Res* 1030:94–102. [CrossRef Medline](#)
- Park H, Poo MM (2013) Neurotrophin regulation of neural circuit development and function. *Nat Rev Neurosci* 14:7–23. [CrossRef Medline](#)
- Pastor AM, Gonzalez-Forero D (2003) Recruitment order of cat abducens motoneurons and internuclear neurons. *J Neurophysiol* 90:2240–2252. [CrossRef Medline](#)
- Pastor AM, Moreno-López B, de la Cruz RR, Delgado-García JM (1997) Effects of botulinum neurotoxin type A on abducens motoneurons in the cat: ultrastructural and synaptic alterations. *Neuroscience* 81:457–478. [CrossRef Medline](#)
- Pastor AM, Delgado-García JM, Martínez-Guijarro FJ, López-García C, de la Cruz RR (2000) Response of abducens internuclear neurons to axotomy in the adult cat. *J Comp Neurol* 427:370–390. [CrossRef Medline](#)
- Reynolds BA, Weiss S (1992) Generation of neurons and astrocytes from isolated cells of adult mammalian central nervous system. *Science* 255:1707–1710. [CrossRef Medline](#)
- Rind HB, Butowt R, von Bartheld CS (2005) Synaptic targeting of retrogradely transported trophic factors in motoneurons: comparison of glial cell line-derived neurotrophic factor, brain-derived neurotrophic factor and cardiotrophin-1 with tetanus toxin. *J Neurosci* 25:539–549. [CrossRef Medline](#)
- Ruiz de Almodovar C, Fabre PJ, Knevels E, Coulon C, Segura I, Haddick PC, Aerts L, Delattin N, Strasser G, Oh WJ, Lange C, Vinckier S, Haigh J, Fouquet C, Gu C, Alitalo K, Castellani V, Tessier-Lavigne M, Chedotal A, Charron F, Carmeliet P (2011) VEGF mediates commissural axon chemoattraction through its receptor Flk1. *Neuron* 70:966–978. [CrossRef Medline](#)
- Salama-Cohen P, Arévalo MA, Grantyn R, Rodríguez-Tébar A (2006) Notch and GF/p75NTR control dendrite morphology and the balance of excitatory/inhibitory synaptic input to hippocampal neurones through Neurogenin 3. *J Neurochem* 97:1269–1278. [CrossRef Medline](#)
- Sathasivam S (2008) VEGF and ALS. *Neurosci Res* 62:71–77. [CrossRef Medline](#)
- Storkebaum E, Lambrechts D, Dewerchin M, Moreno-Murciano MP, Appelmanns S, Oh H, Van Damme P, Rutten B, Man WY, De Mol M, Wyns S, Manka D, Vermeulen K, Van Den Bosch L, Mertens N, Schmitz C, Robberecht W, Conway EM, Collen D, Moons L, Carmeliet P (2005) Treatment of motoneuron degeneration by intracerebroventricular delivery of VEGF in a rat model of ALS. *Nat Neurosci* 8:85–92. [CrossRef Medline](#)
- Sumner BE (1975) An ultrastructural study of normal and injured hypoglossal nuclei after injection of horseradish peroxidase. *Exp Brain Res* 23:463–470. [Medline](#)
- Talaverón R, Matarredona ER, de la Cruz RR, Pastor AM (2013) Neural progenitor cell implants modulate vascular endothelial growth factor and brain-derived neurotrophic factor expression in rat axotomized neurons. *PLoS One* 8:e54519. [CrossRef Medline](#)
- Titmus MJ, Faber DS (1990) Axotomy-induced alterations in the electrophysiological characteristics of neurons. *Prog Neurobiol* 35:1–51. [CrossRef Medline](#)
- Tolosa L, Mir M, Asensio VJ, Olmos G, Lladó J (2008) Vascular endothelial growth factor protects spinal cord motoneurons against glutamate-induced excitotoxicity via phosphatidylinositol 3-kinase. *J Neurochem* 105:1080–1090. [CrossRef Medline](#)
- Tonchev AB, Yamashita T, Guo J, Chaldakov GN, Takakura N (2007) Expression of angiogenic and neurotrophic factors in the progenitor cell niche of adult monkey subventricular zone. *Neuroscience* 144:1425–1435. [CrossRef Medline](#)
- Tovar-Y-Romo LB, Tapia R (2010) VEGF protects spinal motor neurons against chronic excitotoxic degeneration in vivo by activation of the PI3-K pathway and inhibition of p38MAPK. *J Neurochem* 115:1090–1101. [CrossRef Medline](#)
- Whittemore SR, Friedman PL, Larhammar D, Persson H, Gonzalez-Carvajal M, Holets VR (1988) Rat beta-nerve growth factor sequence and site of synthesis in the adult hippocampus. *J Neurosci Res* 20:403–410. [CrossRef Medline](#)
- Wisden W, Morris BJ (2002) In situ hybridization with oligonucleotide probes. *Int Rev Neurobiol* 47:3–59. [CrossRef Medline](#)
- Zachary I (2005) Neuroprotective role of vascular endothelial growth factor: signalling mechanisms, biological function, and therapeutical potential. *Neurosignals* 14:207–221. [CrossRef Medline](#)
- Zhou Z, Liu Q, Davis RL (2005) Complex regulation of spiral ganglion neuron firing patterns by neurotrophin-3. *J Neurosci* 25:7558–7566. [CrossRef Medline](#)