

FISIOLOGIA DE LA RESPUESTA NEURONAL A LA LESION
DEL VI PAR CRANEAL EN EL GATO

Trabajo presentado para optar al grado de Doctor
en Biología por el Licenciado Blas Torres Ruiz.

Sevilla 10 de Octubre de 1985

DIRECTOR Y PONENTE

CODIRECTORA

Dr. José M. Delgado García
Prof. Titular de Fisiología,
adscrito a la Agregaduría de
Fisiología Animal de la
Facultad de Biología de la
Universidad de Sevilla.

M. Rosario Pásaro Dionisio
Prof. Titular de Biología
Animal.

TD 113

TD
113



UNIVERSIDAD DE SEVILLA

FACULTAD DE BIOLOGIA
BIBLIOTECA

Doy mi autorización a la Biblioteca de esta Facultad para que mi Tesis Doctoral Fisiología de la Respuesta Neuronal a la lesión del VI par craneal en sea consultada, según la modalidad/es indicadas: el job

- Consulta en depósito.
- Préstamo interbibliotecario.
- Reproducción parcial.
- Reproducción total.
- Tipo de Usuarios.
- Otros términos.

Firmado:

Sevilla, a 29 de Septiembre de 1990

BLAS TORRES RUIZ



AVDA. REINA MERCEDES, S/N.

TELÉFONO 61 70 11

FISILOGIA ANIMAL
ACULTAD DE BIOLOGIA

SEVILLA - 41012

Don JOSE MARIA DELGADO GARCIA, Profesor Titular de Fisiología, adscrito a la Agregaduría de Fisiología Animal de la Facultad de Biología de la Universidad de Sevilla.

CERTIFICA:

Que D. BLAS TORRES RUIZ ha realizado bajo su dirección el trabajo titulado "Fisiología de la respuesta neuronal a la lesión del VI par craneal en el gato", que presenta para optar al grado de Doctor en Biología por la Facultad de Biología de la Universidad de Sevilla.

Sevilla 10 de Octubre de 1985

Fdo. JOSE MARIA DELGADO GARCIA

A TERE

Expreso mi agradecimiento a todos los que con su colaboración y apoyo han permitido la realización de este trabajo.

El cerebro humano, reflexionando sobre sí, ha descubierto algunas de sus maravillas. Lo que parece necesitarse para comprender cómo funciona son nuevas técnicas para examinarlo y nuevos modos de pensar acerca de él.

"Reflexiones en torno al cerebro"

F.H.C. Crick, 1979

INDICE

PLANTEAMIENTO GENERAL.....	X
1. INTRODUCCION.....	1
1.1 GENERALIDADES.....	2
1.2 CONSIDERACIONES HISTOMETABOLICAS DE LA REACCION NEURONAL RETROGRADA.....	5
1.3 CONSIDERACIONES ELECTROFISIOLOGICAS DE LA REACCION NEURONAL RETROGRADA.....	14
1.4 SEÑAL PARA LA REACCION NEURONAL RETROGRADA.....	25
1.5 REGENERACION NERVIOSA.....	28
1.6 MODELO EXPERIMENTAL ELEGIDO.....	41
1.7 MOVIMIENTOS OCULARES.....	44
1.8 CONSIDERACIONES MORFOFUNCIONALES DE LAS MOTONEURONAS DEL NUCLEO MOTOR OCULAR EXTERNO.....	47
2. OBJETIVOS DEL TRABAJO.....	59
3. MATERIAL Y METODOS.....	62
3.1 TECNICAS HISTOLOGICAS.....	63
3.1.1 CASUISTICA.....	63
3.1.2 PROCESAMIENTO DE LOS ANIMALES. METODICA DE LA INYECCION DE LA PEROXIDASA DE RABANO.....	63
3.1.3 PROCESAMIENTO DE LOS CEREBROS. FIJACION Y TECNICAS HISTOQUIMICAS.....	67
3.1.3.1 VARIANTES APLICADAS A LA TECNICA DE LA PEROXIDASA DE RABANO.....	72
3.1.4 ESTUDIO DEL MATERIAL.....	73

3.2 TECNICAS ELECTROFISIOLÓGICAS.....	74
3.2.1 DISEÑO EXPERIMENTAL.....	74
3.2.2 CASUÍSTICA.....	76
3.2.3 PROCEDIMIENTO QUIRÚRGICO.....	76
3.2.4 ESTIMULACIÓN.....	84
3.2.5 REGISTRO DE LOS MOVIMIENTOS OCULARES.....	86
3.2.6 REGISTRO EXTRACELULAR.....	87
3.2.7 VERIFICACIÓN HISTOLÓGICA.....	88
3.2.8 ADQUISICIÓN Y ANÁLISIS DE DATOS.....	89
4. RESULTADOS.....	93
4.1 VARIANTES APLICADAS A LA TÉCNICA DE LA PEROXIDASA DE RABANO.....	94
4.1.1 VARIANTES APLICADAS EN EL PROTOCOLO DE REVELADO CON TETRAMETILBENZIDINA.....	94
4.1.2 VARIANTES APLICADAS EN EL PROTOCOLO DE REVELADO CON DIAMINOBENZIDINA.....	96
4.2 EFECTOS DE LA AXOTOMÍA SOBRE LA MORFOLOGÍA DE LAS MOTONEURONAS DEL NÚCLEO MOTOR OCULAR EXTERNO.....	98
4.3 EFECTOS DE LA AXOTOMÍA SOBRE LA MECÁNICA OCULAR.....	102
4.4 IDENTIFICACIÓN ANTIDRÓMICA DE LAS MOTONEURONAS AXOTOMIZADAS DEL NÚCLEO MOTOR OCULAR EXTERNO.....	106
4.5 ACTIVIDAD DE LAS MOTONEURONAS AXOTOMIZADAS DEL NÚCLEO MOTOR OCULAR EXTERNO.....	109
4.6 ANÁLISIS DE LA ACTIVIDAD DE LAS MOTONEURONAS AXOTOMIZADAS DEL NÚCLEO MOTOR OCULAR EXTERNO.....	112
4.6.1 ANÁLISIS DE LA ACTIVIDAD DURANTE FIJACIONES OCULARES.....	112

4.6.2 ANALISIS DE LA ACTIVIDAD DURANTE MOVIMIENTOS OCULARES SACADICOS: ASPECTOS GENERALES.....	116
4.6.3 ANALISIS DE LA ACTIVIDAD DURANTE MOVIMIENTOS OCULARES SACADICOS: FASE INICIAL.....	122
4.6.4 ANALISIS DE LA ACTIVIDAD DURANTE MOVIMIENTOS OCULARES SACADICOS: FASE FINAL.....	128
4.6.5 ANALISIS DE LA ACTIVIDAD DURANTE ESTIMULACION VESTIBULAR.....	130
5. DISCUSION.....	170
5.1 VARIANTES APLICADAS A LA TECNICA DE LA PEROXIDASA DE RABANO.....	171
5.2 EFECTOS DE LA AXOTOMIA SOBRE LA MORFOLOGIA DE LAS MOTONEURONAS DEL NUCLEO MOTOR OCULAR EXTERNO.....	174
5.3 IDENTIFICACION ANTIDROMICA DE LAS MOTONEURONAS AXOTOMIZADAS DEL NUCLEO MOTOR OCULAR EXTERNO.....	177
5.4 ACTIVIDAD DE LAS MOTONEURONAS AXOTOMIZADAS DEL NUCLEO MOTOR OCULAR EXTERNO DURANTE MOVIMIENTOS OCULARES ESPONTANEOS.....	179
5.5 ACTIVIDAD DE LAS MOTONEURONAS AXOTOMIZADAS DEL NUCLEO MOTOR OCULAR EXTERNO DURANTE MOVIMIENTOS OCULARES INDUCIDOS VESTIBULARMENTE.....	187
5.6 CONSIDERACIONES FINALES.....	189
6. CONCLUSIONES.....	193
7. BIBLIOGRAFIA.....	199

PLANTEAMIENTO GENERAL

La interrupción de una vía nerviosa provoca de una parte la imposibilidad del transporte de metabolitos entre el soma y el terminal nervioso y, de otra, la pérdida de funcionalidad en la misma. Esta interrupción origina así mismo la aparición de numerosas alteraciones bioquímicas, ultraestructurales, morfológicas, electrofisiológicas y neurofisiológicas, tanto en las neuronas afectadas como en aquellas conectadas sinápticamente a las mismas. Desde hace más de un siglo el examen de estas modificaciones neuronales ha sido el objetivo de numerosos investigadores en el área de la neurobiología.

La respuesta neuronal a la lesión es un modelo experimental muy utilizado en diversas líneas de investigación de gran interés neurobiológico, entre las que destacan: a) Plasticidad neuronal y aprendizaje; b) Desarrollo del sistema nervioso; y c) Fisiopatología de la regeneración nerviosa. Dentro de estas líneas de investigación, nuestra aportación se ha centrado en la búsqueda de una respuesta experimental a las siguientes cuestiones: a) ¿Cambian los patrones morfométricos o citoarquitectónicos de las poblaciones neuronales lesionadas?; b) ¿Mantienen las neuronas axotomizadas una actividad funcional normal durante el proceso de regeneración?; y c) ¿Pueden justificar las características morfológicas de las células lesionadas su actividad funcional?. Estas preguntas se encuentran desglosadas en

los distintos objetivos que se han pretendido cubrir en esta tesis doctoral (ver apartado 2 OBJETIVOS DEL PRESENTE TRABAJO).

En el presente trabajo se estudian los efectos de la axotomía sobre las motoneuronas del núcleo motor ocular externo desde dos puntos de vista: morfológico y neurofisiológico. Por una parte y con ayuda de la técnica de transporte retrógrado de la peroxidasa de rábano se han estudiado las características morfométricas y citoarquitectónicas de dichas motoneuronas tras su axotomía. Por otra parte, mediante técnicas de registro de la actividad eléctrica neuronal en el animal despierto, se ha estudiado la actividad funcional de dichas motoneuronas desde su lesión hasta un año después de ocasionada ésta. La aplicación de estas técnicas ha permitido, en el primer caso, evaluar las características morfológicas de aquellas motoneuronas capaces de reinervar al músculo ocular recto externo, y, en el segundo caso, seguir la evolución funcional de las motoneuronas lesionadas en un mismo animal sin la presencia de anestésicos.

1 INTRODUCCION

1.1 GENERALIDADES

El efecto que produce la lesión de nervios periféricos en vertebrados es, por una parte, la degeneración distal del axón seccionado (degeneración walleriana) y, por otra, una remodelación histometabólica de la porción proximal (reacción neuronal retrógrada). Este proceso de remodelación proximal tiende a la reinervación de la célula blanco. En los casos (conocidos) en que dicho proceso fracasa la neurona sufre un fenómeno de lisis celular (Sunderland, 1978; Selzer, 1980; Kelly, 1981).

En el sistema nervioso central (SNC) se ha venido aceptando que la regeneración del elemento distal es inviable (Clemente, 1964; Guth, 1975; Sumner, 1980). Esto se ha explicado por la formación de excesivo tejido cicatricial (Barron y col., 1981). Sin embargo, recientemente (Kawaguchi y col., 1981; Foerster, 1982) se ha demostrado que el SNC es capaz de regenerarse en respuesta a lesiones muy localizadas. Foerster (1982) ha observado que esta regeneración no es por reposición de la parte del axón perdido, sino por reconexión de las porciones proximal y distal del axón dañado. En cualquier caso, esta respuesta es bastante diferente de la que aparece en el sistema nervioso periférico (SNP) (Ramón y Cajal, 1914), pero muy parecida a

la clásicamente descrita en invertebrados (Bittner y Johnson, 1974; Birse y Bittner, 1976). Aunque insuficientemente estudiada hasta la fecha, la reconexión de los cabos distal y proximal del axón lesionado no parece tener un carácter funcional (Barron, 1983).

La intensidad de la respuesta neuronal retrógrada a la lesión se modifica por los siguientes factores: a) Especie animal; dentro de los mamíferos se encuentran variaciones histológicas según la especie seleccionada; b) Naturaleza de la lesión; los tipos experimentales de lesión más utilizados son la sección quirúrgica, el aplastamiento, la cauterización y la interrupción del transporte axonal mediante colchicina. La axotomía quirúrgica es el tipo de lesión más utilizado y el que infiere mayores daños a la célula; c) Proximidad de la lesión al soma neuronal; el acercamiento de la lesión al soma ocasiona alteraciones más intensas y prolongadas, así como una mayor incidencia de muerte neuronal; d) Edad del animal; en individuos jóvenes la lesión incrementa la muerte neuronal; e) Localización y naturaleza de la neurona lesionada; por ejemplo, la respuesta neuronal es más intensa en las neuronas de los ganglios espinales que en las del tronco del encéfalo; y f) Presencia simultánea de deafferentización por impactos naturales o experimentales ocasionados por la lesión (Sunderland, 1978; Ducker, 1980; Selzer, 1980; Barron, 1983).

Como se ha señalado, en los fenómenos de degeneración y regeneración neuronal tiene especial incidencia la especie elegida como modelo experimental. Las principales razones que influyen en la elección de un modelo experimental concreto son: a) Invertebrados; las ventajas de este grupo son, por un lado, un sistema nervioso constituido por un pequeño número de células, en el que se pueden identificar con facilidad las neuronas lesionadas y, por otro lado, el disponer de neuronas de gran tamaño lo que facilita su estudio morfológico y electrofisiológico (Kuwada, 1981; Pellegrino y col., 1984); b) Vertebrados inferiores; dentro de este grupo se incluyen algunas especies de peces, anfibios y reptiles. La principal ventaja de este grupo es la alta capacidad y especificidad de regeneración de sus elementos neuronales (Sperry, 1951; Elizalde y col., 1983; Jacobson, 1978); y c) Vertebrados superiores; dentro de este grupo se incluyen solamente a mamíferos. El estudio de los procesos de regeneración neuronal en mamíferos tiene un especial interés clínico. En este sentido, el estudio de los grupos anteriores no parece ser muy provechoso por los mecanismos tan diferentes de respuesta neuronal que presentan (Selzer, 1980; Baker y col., 1985).

1.2 CONSIDERACIONES HISTOMETABOLICAS DE LA REACCION NEURONAL RETROGRADA

La existencia de un proceso de respuesta neuronal a la axotomía es conocida e investigada desde 1892, cuando Nissl la describió. Este proceso se cuantificó minuciosamente por Barr y Hamilton en 1948 para las motoneuronas que envían sus axones por el nervio ciático del gato. La descripción original de Nissl se ha comprobado en diferentes tipos neuronales, como las motoneuronas espinales y troncoencefálicas, las neuronas piramidales de la columna de Clark y las neuronas del sistema nervioso vegetativo (Lieberman, 1971).

El cuadro histológico de la reacción neuronal retrógrada se inicia entre 24 y 72 horas después de la lesión axonal. La sustancia basófila de Nissl, la cual está compuesta de las ribonucleoproteínas del retículo endoplásmico rugoso, comienza a romperse en pequeños gránulos que se dispersan por el citoplasma. A este proceso se le denomina cromatolisis. Al mismo tiempo el soma y el núcleo neuronal se hinchan; además, este último se desplaza hacia la membrana citoplasmática. El nucleolo también aumenta de tamaño. Aparece un incremento en el número de

lisosomas y del complejo de Golgi. Por su parte, las mitocondrias se muestran vacuoladas (Lieberman 1971, Sunderland 1978, Selzer 1980, Barron 1983) (figura 1). Estos cambios aparecen en su máxima intensidad tres semanas después de la lesión, aunque pueden observarse hasta un año después de la misma (Cragg, 1970). Por otro lado, dentro de una misma población neuronal la intensidad de los cambios es variable (Smolen y Truex, 1977).

Acompañando a los cambios histológicos aparecen numerosas modificaciones en el metabolismo celular, orientadas a la producción de proteínas estructurales, líticas o relacionadas con los mecanismos de neurotransmisión (Cragg, 1970; Lieberman, 1971; Watson, 1974; Grafstein y McQuarrie, 1978; Barron, 1981). En este sentido se ha encontrado un aumento de la actividad fosfatasa ácida, y una disminución en la producción de enzimas relacionadas con la neurotransmisión, como acetilcolina transferasa y acetilcolinesterasa. Por otro lado, elementos destacados en la conducción del impulso como la actividad de la ATPasa de sodio-potasio o los canales de sodio, también sufren un decremento en su actividad y/o síntesis (Kuwada y Wine 1981, Goldman y col., 1983). En respuesta a la axotomía, las neuronas del SNP muestran un incremento generalizado en el consumo de glucosa, en la concentración de las enzimas relacionadas con el catabolismo de dicha molécula, en la cantidad de ARN, así como en la disponibilidad de

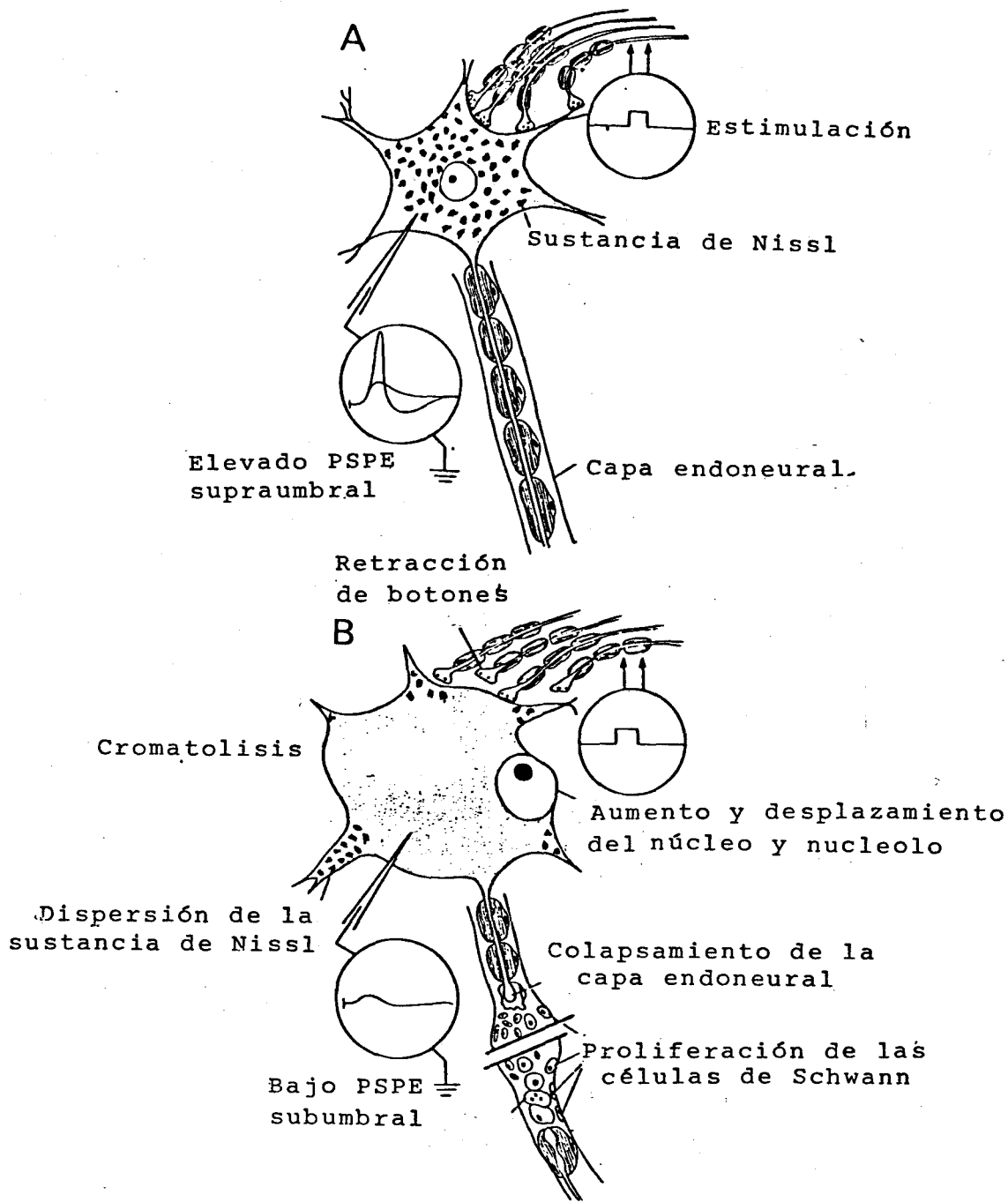


Figura 1.- Resumen de los cambios morfológicos y fisiológicos que ocurren en las motoneuronas espinales tras su axotomía. A, motoneurona control; B, después de la lesión. (Tomada de Selzer, 1980).

determinadas proteínas estructurales. Todo ello se ha demostrado mediante técnicas de incorporación de precursores radioactivos (Watson, 1968; Smith y col., 1984; Wells, 1984).

Los cambios celulares que aparecen durante la reacción neuronal retrógrada son la consecuencia de tres procesos de origen distinto: disruptivos, regulativos y regenerativos (Grafstein, 1983). Las alteraciones disruptivas son las que se ocasionan por la propia lesión celular, por lo que son comunes a todas las células lesionadas y no específicas de neuronas. Ejemplo de ello es la destrucción del retículo endoplásmico rugoso por entrada de iones calcio (Farber, 1981). Las alteraciones regulativas abarcan aquellos procesos metabólicos que se modifican como consecuencia de la pérdida de la interacción trófica del terminal axónico con el soma neuronal; por ejemplo, el aumento de la síntesis de ARNm en el nucleolo. Estas modificaciones aparecen aún cuando no se produzca una sección completa del axón, como en el caso del bloqueo axoplásmico con la colchicina (Watson, 1974; Reis y col., 1978). Las remodelaciones regenerativas incluyen un conjunto de cambios dirigidos a la producción de materiales que aseguren la reconstrucción y el buen funcionamiento del trozo de axón perdido (Skene y Willard, 1981). Las neuronas del SNC lesionadas sólo muestran alteraciones del primer y segundo grupo.

Formando parte del cuadro histológico de la reacción neuronal retrógrada, se ha descrito en motoneuronas espinales y troncoencefálicas la retracción del arbol dendrítico, el cual se reexpande simultáneamente con el proceso de reinervación muscular (Sumner y Watson, 1971; Standler y Bernstein, 1982; Bernstein y col., 1984). Este fenómeno no se ha podido comprobar en las motoneuronas del núcleo motor ocular externo (Baker y col., 1981) (figura 2). Otra característica de la respuesta neuronal a la lesión es la retracción de botones sinápticos aferentes (Mendell y col., 1974; Sumner, 1975 a y b; Chen, 1978; Sterman y Sposito, 1984). Al igual que para el fenómeno anterior, el contacto sináptico se recupera con la reinervación apropiada de las células blanco (Sumner, 1976).

Finalmente conviene señalar que los efectos de la lesión se traducen en alteraciones histometabólicas en la propia neurona así como en las conectadas sinápticamente a la misma. A este efecto se le denomina degeneración transneuronal (Cragg, 1970; Purves y Thompson, 1979; Kelly, 1981; Ygge y Aldskogius, 1984).

Clásicamente la respuesta neuronal a la lesión se ha estudiado con técnicas como la tinción de Nissl, cresil violeta o azul de toluidina (Smolen y Truex, 1977; Kawamura y Dyck, 1981; Simonati y col., 1983). Estos métodos son

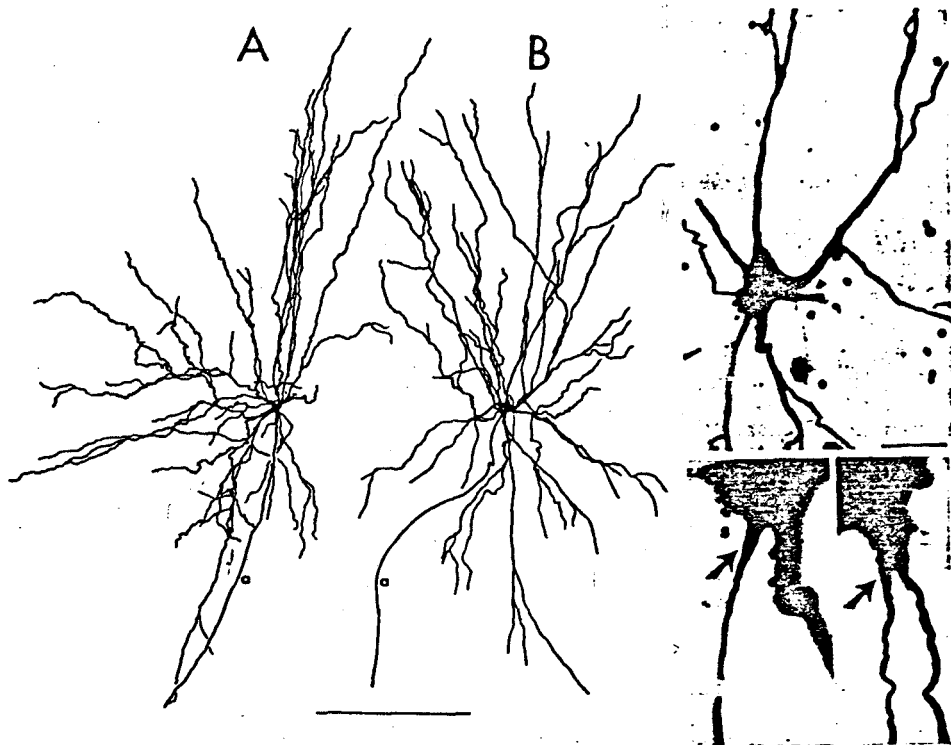


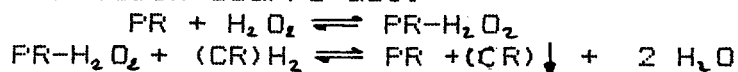
Figura 2.- Microfotografías (drcha.) y reconstrucción (izda.) de dos motoneuronas control (A) y axotomizada (B) del núcleo motor ocular externo inyectadas intracelularmente con peroxidasa de rábano. Nótese que las dimensiones del árbol dendrítico y del segmento inicial no se afectan por la lesión. Barra 0,5 mm y 50 μ m, en el dibujo y las microfotografías, respectivamente. (Tomada de Baker y col., 1981).

válidos para evaluar cualitativamente los efectos de la lesión en aquellos tipos neuronales que presentan un cuadro histológico muy claro y que a su vez sean muy fáciles de identificar. Sin embargo, en estudios cuantitativos se está imponiendo el uso de técnicas de marcaje retrógrado, las cuales facilitan la identificación de todas las neuronas lesionadas, en el supuesto de que no sufran muerte celular. Entre estas técnicas la más utilizada es la de la peroxidasa de rábano (Sumner, 1975 b; Brushart y Mesulam, 1980; Mizumo y col., 1980; Aldskogius y col., 1983; Goshgarian y col., 1983; Pásaro y col., 1985)*.

La porción distal del axón lesionado sufre un proceso degenerativo, cuyas características se describieron por Waller en 1850. Posteriormente diferentes autores han

*Los principios básicos de la actividad enzimática de la peroxidasa de rábano se describieron a finales del siglo pasado. Así mismo es conocida su composición molecular y características bioquímicas (Mesulam, 1982). La peroxidasa de rábano no se utilizó como marcador de vías nerviosas hasta el año 1968 por Zimmerman. Se sabe que esta enzima no difunde libremente a través de las membranas biológicas, sino que es captada en vesículas endocíticas y transportada retrógradamente hasta el soma. Gracias a ello se pueden identificar aquellos grupos neuronales de interés. Para el revelado de la reacción se utilizan sustancias cromógenas derivadas de la benzidina (diaminobenzina, tetrametilbenzidina) que se colorean y depositan cuando son oxidadas.

La reacción ocurre así:



donde PR, es la enzima peroxidasa y CR la sustancia cromógena (para más detalles ver apartado 3.1 TÉCNICAS HISTOLÓGICAS).

confirmado y extendido dicha descripción (Sunderland, 1978; Allt, 1976; Selzer, 1980; Lubinska, 1982). Los primeros cambios ocurren 24 horas después de la lesión, comenzando por un engrosamiento de la zona traumatizada, el cual se acompaña por fragmentación del retículo endoplásmico y acumulación de mitocondrias. Posteriormente, la degeneración progresa hasta el terminal nervioso caracterizándose por un hinchamiento de las mitocondrias y la desorganización y rotura de neurofilamentos y neurotúbulos. Todos estos fenómenos son puestos en marcha por la entrada de calcio en el terminal nervioso (Farber, 1981). Finalmente, la membrana plasmática se fragmenta, de modo que en 3 ó 4 días adquiere un aspecto varicoso, en forma de rosario. Este proceso degenerativo es más rápido en las fibras de pequeño tamaño. La mielina, en aquellos axones que la presentan, desorganiza sus capas y se fragmenta por los nodos de Ranvier. Los productos finales de degeneración son degradados por macrófagos. El proceso de reabsorción de los restos axonales dura más de un mes, mientras que el tubo endoneural se retrae y termina por colapsarse, a no ser que nuevos axones regenerativos procedentes del cabo proximal lo invadan. Por su parte, la porción proximal se retrae y engrosa, formándose lo que se denomina "cono de crecimiento" que en las motoneuronas es la estructura precursora de la regeneración axonal (Grafstein, 1975; Selzer, 1980; Sumner, 1980). Por último,

la conducción de potenciales de acción, así como la transmisión neuromuscular desaparecen completamente en la porción axónica distal unos días después de la lesión. La aparición de estas alteraciones funcionales es variable, dependiendo del diámetro del axón y de la presencia de mielina (Gilliat y Hjorth, 1972).

1.3 CONSIDERACIONES ELECTROFISIOLÓGICAS DE LA REACCIÓN NEURONAL RETROGRADADA

Junto a las alteraciones histometabólicas anteriormente descritas, las neuronas lesionadas presentan numerosos cambios en sus características electrofisiológicas (animal agudo) y neurofisiológicas (animal crónico). Dichos cambios se han explicado en base a tres tipos de modificaciones: a) En la eficacia funcional de las sinápsis de la neurona lesionada (Kuno y Llinás, 1970 a y b; Heyer y Llinás, 1977; Gallego y col., 1980; Takata y col., 1980; Takata y Nagahama, 1983); b) En las propiedades pasivas o activas de la membrana plasmática de la neurona lesionada (Eccles y col., 1958; Gustafsson, 1979; Kuwada, 1981; Gustafsson y Pinter, 1984); y c) En la pérdida de la interacción trófica con la célula blanco (Kuno y col., 1974; Czéh y col., 1978; Gallego y col., 1979; Gallego, 1984). Las modificaciones en uno o más de los tres niveles mencionados producen respuestas anómalas en la actividad de las neuronas afectadas (Heyer y Llinás, 1977; Ribas y col., 1982; Delgado-García y col., 1985 b; Torres y col., 1985 a y b).

Los cambios en la eficacia sináptica se han atribuido a modificaciones de los postpotenciales sinápticos

y/o de la sensibilidad dendrítica a la transmisión sináptica. Se ha descrito una disminución en la amplitud (hasta un 70%) (Eccles y col., 1958; Purves, 1975; Gallego y col., 1980), y velocidad de generación de los postpotenciales sinápticos excitadores en motoneuronas espinales axotomizadas. Esta observación es extensible a otros tipos neuronales (Mendell y col., 1974; Matthews y Nelsson, 1975; Purves, 1975; Mendell y col., 1976; Purves y Lichtman, 1978; Farel, 1978; Purves y Thompson, 1979; Takata y col., 1980). Al parecer, junto con la reinervación apropiada de las células blanco, se recuperan las características funcionales de los postpotenciales sinápticos (Gallego y col., 1980).

La influencia que ejerce la axotomía sobre los postpotenciales sinápticos inhibidores ha sido menos estudiada. No obstante, diversos autores han encontrado una afectación similar a la descrita para los postpotenciales sinápticos excitadores (Kuno y Llinás, 1970 a; Baker y col., 1981; Takata y Nagahama, 1983; Havton y Kellerth, 1984). Es de señalar que en motoneuronas axotomizadas del núcleo motor ocular externo, se ha demostrado la pérdida de postpotenciales sinápticos inhibidores (Delgado-García y col., 1978; Baker y col., 1981) (figura 3).

Según el modelo de Rall y col. (1967) los postpotenciales sinápticos mantienen características

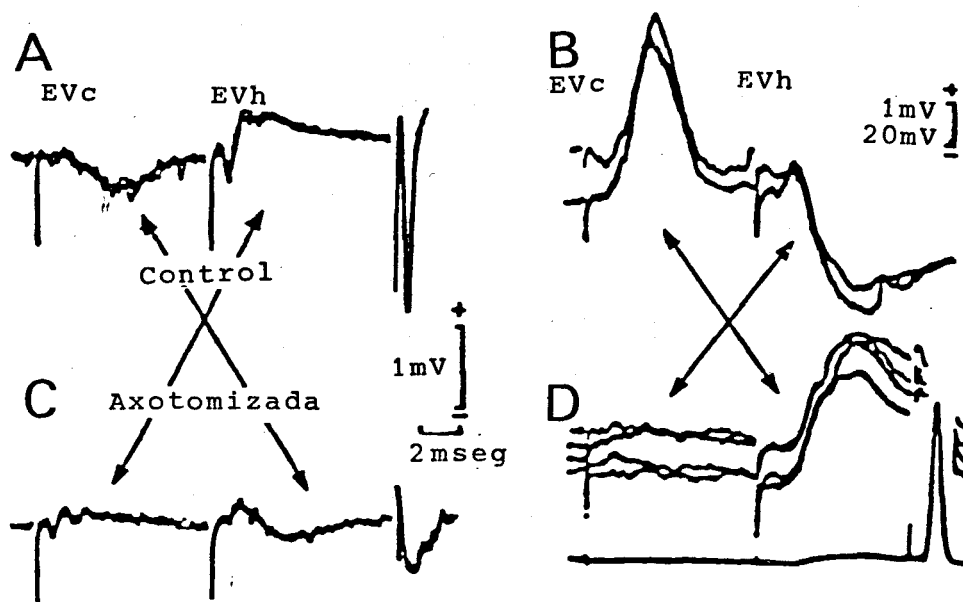


Figura 3.- Registro intracelular de motoneuronas controles (A y C) y axotomizadas (B y D) del núcleo motor ocular externo mostrando la pérdida de los postpotenciales sinápticos inhibitorios en estas últimas. Evc, EVh, estimulación vestibular contralateral y homolateral, respectivamente. Calibraciones como se indican. (Tomada de Baker y col., 1981).

funcionales particulares según el compartimiento neuronal (segmento inicial, soma, dendritas primarias, secundarias, etc.) donde se produzcan. En base a dicho modelo, Kuno y Llinás (1970 a) han explicado las modificaciones en los postpotenciales sinápticos por retracción de los botones sinápticos aferentes al soma neuronal. Estos resultados, sugeridos inicialmente mediante consideraciones electrofisiológicas, se han confirmado a nivel ultraestructural (Sumner, 1976).

Las motoneuronas espinales axotomizadas muestran la aparición de potenciales de acción, es decir, respuestas parciales todo o nada, de origen dendrítico (Kuno y Llinás, 1970 b; Heyer y Llinás, 1977). Este hecho se ha explicado por el aumento en la sensibilidad de determinadas áreas dendríticas, preferentemente alejadas al soma neuronal, con objeto de compensar la disminución de los postpotenciales sinápticos activadores. Las respuestas parciales de origen dendrítico no han sido detectadas en todos los modelos experimentales (Mendell y col., 1976), como, por ejemplo, en las motoneuronas axotomizadas del núcleo motor ocular externo (Baker y col., 1981).

La excitabilidad neuronal depende de factores de tipo morfométrico (Stein y Bertoldi, 1981; Highstein y col., 1982) y de las propiedades pasivas y/o activas de la membrana plasmática (Kuwada, 1981; Catterall, 1984). En

relación con este último grupo de factores, Eccles y col. (1958) han observado que las motoneuronas espinales axotomizadas del gato presentan potenciales de membrana, capacitancia, resistencia de entrada, amplitudes del potencial de acción y de los postpotenciales similares en todo a los de las motoneuronas controles. Sin embargo, diversos autores han apuntado la presencia de sutiles cambios en alguno de estos parámetros. Por ejemplo, se ha comprobado que la resistencia iónica de entrada en las motoneuronas espinales axotomizadas se incrementa con respecto a la de los controles y que, en cambio, hay una disminución de la capacitancia celular (Gustafsson y Pinter, 1984) (figura 4). Además, se han observado modificaciones en la duración de la posthiperpolarización que sigue a un potencial de acción o en la constante de tiempo celular (Gustafsson y Pinter, 1984). Las (posibles) modificaciones de las propiedades activas de las membranas de las neuronas axotomizadas son poco conocidas. En diferentes especies de invertebrados, se ha demostrado un aumento en la conductancia iónica para el sodio y el potasio, lo que incrementa la excitabilidad neuronal (Kuwada, 1981; Kuwada y Wine, 1981; Pellegrino y col., 1984).

El aumento de excitabilidad neuronal se ha atribuido a un intento de las motoneuronas espinales axotomizadas de facilitar la respuesta del arco reflejo, respuesta que disminuye normalmente tras la axotomía

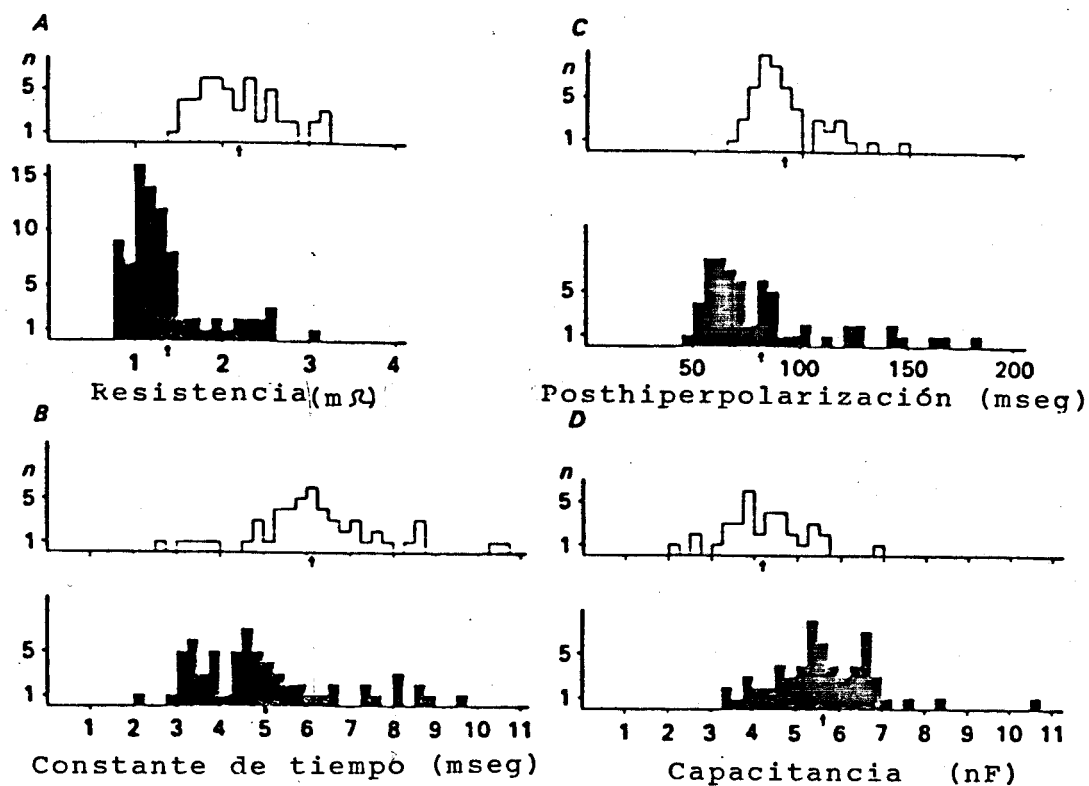


Figura 4.- Distribución de las propiedades eléctricas de las motoneuronas α espinales (histogramas rellenos) y axotomizadas. A, resistencia iónica de entrada; B, constante de tiempo de la membrana; C, duración de la posthiperpolarización que sigue a un potencial de acción; D, capacitancia celular. (Tomada de Gustaffson y Pinter, 1984).

(Campbell, 1944). Si el aumento de excitabilidad de las motoneuronas espinales, tras la axotomía, no compensa completamente la disminución de la respuesta del arco reflejo espinal es por la ya mencionada disminución en la amplitud y velocidad de generación de los postpotenciales sinápticos activadores (Eccles y col., 1958; Kuno y Llinás, 1970 a y b; Gallego y col., 1980). Resultados similares se han obtenido en otros modelos experimentales de mamíferos (Takata y col., 1980; Takata y Nagahama, 1983) y de vertebrados inferiores (Farel, 1978; 1980; Roederer y Cohen, 1983).

Las motoneuronas del núcleo motor ocular externo axotomizadas no presentan modificaciones en las características pasivas de la membrana al mantener el potencial de reposo y la resistencia de entrada invariables (Baker y col., 1981). Contrariamente a lo observado en las motoneuronas espinales, las del núcleo motor ocular externo presentan un decremento en su excitabilidad a nivel del segmento inicial, que es la zona de menor umbral en la neurona (Baker y col., 1981; Serra y col., 1982). Concretamente, se ha encontrado que la invasión antidrómica del segmento inicial no siempre es posible ni aún con estímulos supraumbrales. Por otra parte, se ha observado en el mismo modelo experimental que la invasión antidrómica se facilita por la estimulación sináptica de carácter excitador (Baker y col., 1981).

En las neuronas axotomizadas se ha descrito una disminución en la velocidad de conducción de la porción proximal del axón (Kuno y col., 1974; Mendell y col., 1976; Huizar y col., 1977; Serra y col., 1982; Blight, 1983). Según estos autores, después de la axotomía aparece un descenso del 20-40% en la velocidad de conducción. Desde el punto de vista morfológico se ha encontrado que, tras la axotomía, la porción proximal de los axones disminuye en un 10-15% su diámetro. También se ha descrito una disminución en la distancia entre nodos de Ranvier (Cragg y Thomas, 1964). Ambos factores explican en parte la disminución de la velocidad de conducción. Este fenómeno está también relacionado con la proximidad de la lesión al soma neuronal (Delgado-García y col., 1982). La velocidad de conducción se mantiene disminuida incluso meses después de la lesión (Cragg y Thomas, 1964; Delgado-García y col., 1982). Sin embargo, tras un periodo de tiempo suficientemente largo, la velocidad de conducción vuelve a ser normal (Selzer, 1980). No obstante, para algunos autores la velocidad de conducción no se modifica tras la axotomía (Gilliat y Hjorth, 1972; Sumner, 1980). La disminución de la velocidad de conducción, según estos investigadores, se puede deber a un bloqueo específico de las fibras de conducción más rápida.

Recientemente se han demostrado alteraciones electrofisiológicas en las neuronas lesionadas, provocadas por la falta de aporte de factores tróficos periféricos que

la axotomía ocasiona. La duración de la posthiperpolarización que sigue a un potencial de acción es una propiedad fundamental que controla la velocidad con que dichos potenciales se producen; cuanto mayor es su duración menor es la frecuencia de disparo de la motoneurona. A su vez, la frecuencia de disparo de las motoneuronas determina la velocidad de contracción de las fibras que inerva; así la descarga de baja frecuencia de las motoneuronas del sóleo, causa la baja velocidad de contracción de las fibras musculares. Por el contrario las motoneuronas que inervan al gastrocnemio presentan una alta frecuencia de disparo. Tras la axotomía de ambos tipos neuronales se ha encontrado una disminución en la duración de la posthiperpolarización de las motoneuronas del sóleo, mientras que la de las motoneuronas del gastrocnemio apenas se modifica (Kuno y col., 1974; Huizar y col., 1977) (figura 5). Los cambios en la duración de la posthiperpolarización, tras la axotomía, parecen ocurrir en el sentido de la "desdiferenciación funcional" (Kuno y col., 1974). Dado que los cambios en la duración de la posthiperpolarización provocados por la axotomía se recuperan con la reinervación, se ha propuesto que el músculo mantiene la duración característica de dicha posthiperpolarización. Existen diferentes pruebas experimentales que refuerzan esta hipótesis. Así la inmovilización muscular o cualquier otro mecanismo que lleve a la atrofia por inactividad muscular provoca efectos similares (Czéh y col., 1978; Gallego y col., 1979; Gallego,

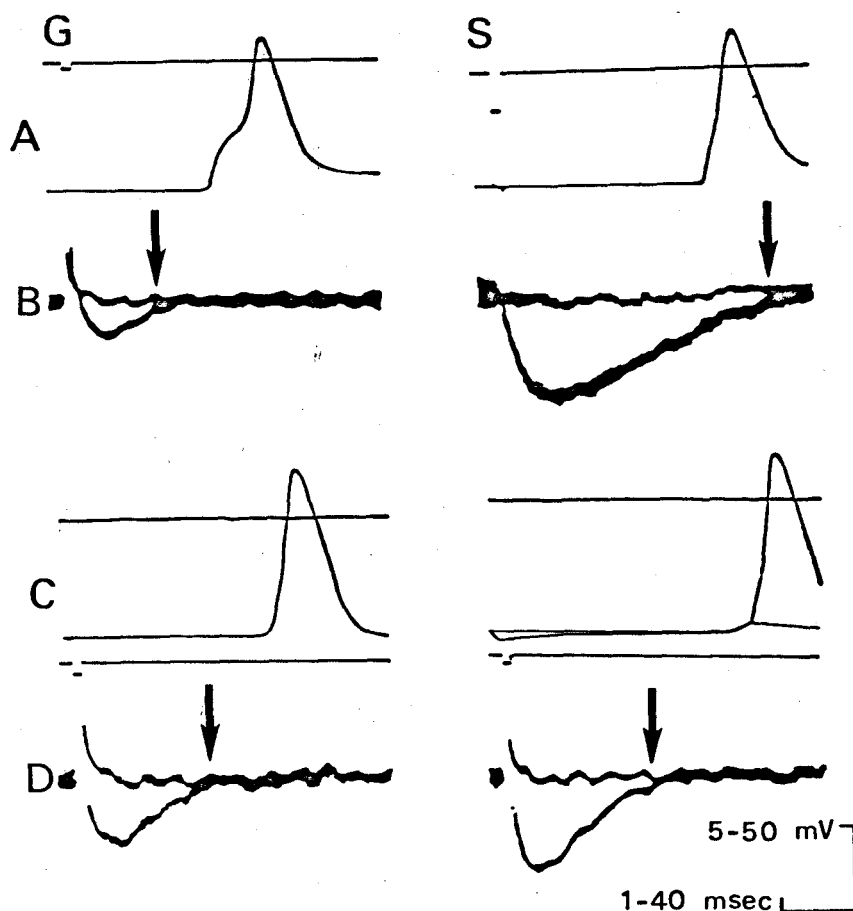


Figura 5.- Efectos de la axotomía sobre la duración de los postpotenciales hiperpolarizadores que siguen a un potencial de acción. A, potencial de acción evocado antidrómicamente en las motoneuronas de gastrocnemio (G) y sóleo (S) controles; B, duración del postpotencial hiperpolarizador para ambos tipos de motoneuronas controles; C,D, registros similares a A y B, respectivamente, para las motoneuronas lesionadas. Nótese el acortamiento del postpotencial hiperpolarizador de las motoneuronas del sóleo lesionadas. Calibraciones como se indican. (Tomada de Kuno y col., 1974).

1984). En este sentido se ha propuesto que la posthiperpolarización (y probablemente algunas otras propiedades eléctricas) de las motoneuronas en el animal adulto dependen de algún factor trófico producido por el metabolismo muscular (Gallego y col., 1979; Gallego, 1984).

El resultado global de las modificaciones electrofisiológicas neuronales ocasionadas por la axotomía es una alteración en el comportamiento de la neurona lesionada (Heyer y Llinás, 1977; Gustafsson, 1979). Las motoneuronas espinales en el gato disparan rítmicamente durante movimientos y durante posiciones mantenidas. La descarga repetitiva puede ser inducida por inyección de corriente a través de microelectrodos intracelulares. Hay evidencias (Kernell, 1965) de que las entradas sinápticas y la inyección de corriente por medio de microelectrodos producen un efecto similar. En base a estos criterios, se ha estudiado la relación frecuencia de disparo/entrada de corriente en lo que comunmente se denomina curvas $f-I$, tanto para motoneuronas controles como para axotomizadas. En este sentido Gustafsson (1979) no observó diferencias significativas entre las motoneuronas controles y axotomizadas. Sin embargo, Heyer y Llinás (1977) han descrito una mayor respuesta a la inyección de corriente (entre 5 y 15 nA) en las motoneuronas axotomizadas, mientras que cuando la corriente inyectada es superior a 40 nA no se aprecian cambios significativos.

1.4 SEÑAL PARA LA REACCIÓN NEURONAL RETROGRADA

La detección de la señal que pone en marcha el proceso de respuesta neuronal a la lesión ha sido desde hace años un punto de atención de la neurobiología (Cragg, 1970; Lieberman, 1971; Grafstein y McQuarrie, 1978). De acuerdo con Grafstein (1983), la respuesta neuronal a la lesión es un proceso complejo que incluye alteraciones específicas para la restitución estructural o funcional de la vía afectada y alteraciones inespecíficas originadas por el daño que supone la lesión. El objetivo experimental ha sido pues la identificación de la señal específica para la reacción neuronal retrógrada. El efecto de la señal es dirigir el metabolismo neuronal del mantenimiento celular normal a la regeneración de la porción de axón perdida. Es posible que la respuesta neuronal se induzca por un cambio en la expresión genética, lo que implica transcripción de nuevos genes y aumento de síntesis de ARNm, por lo que el nucleolo aumenta de tamaño.

Aunque no se conoce su naturaleza, son varias las características del mecanismo de la señal específica para la regeneración que se pueden inferir de los resultados experimentales. Por ejemplo, se sabe que la señal debe viajar por el axón y que la intensidad con la que actúa

depende particularmente de la proximidad de la lesión al soma neuronal. También se sabe que agentes bloqueantes de la síntesis de ARN son capaces de detener la reacción neuronal. Se han propuesto hasta diez orígenes distintos de la señal para la regeneración (Cragg, 1970), aunque los más verosímiles parecen ser la estructura denervada o la zona de lesión. Recientemente, se ha propuesto que la afectación exclusiva del elemento postsináptico induce respuestas similares a las producidas por la axotomía (Gallego, 1984). La hipótesis de que la señal se produce por el metabolismo del elemento postsináptico tiene como argumento desfavorable el que la intensidad y velocidad de la respuesta neuronal no se afectan por la proximidad de la lesión al soma neuronal, como de hecho ocurre. Para Cragg (1970) la hipótesis que mejor conjuga los resultados obtenidos en distintas experiencias, es aquella que supone la pérdida de una sustancia represora, producida por la propia célula, con la axotomía. Esta hipótesis supone que las neuronas producen una proteína que reprime la transcripción en ARNm de los genes relacionados con la regeneración, y además favorece su propia síntesis. Esta proteína sería exportada por el axón. Si se secciona un axón se produce un incremento transitorio en la exportación del axoplasma con lo que la cantidad de proteína cerca del núcleo disminuye favoreciéndose la desrepresión del grupo de genes relacionados con la regeneración, a la par que una inhibición de su propia síntesis. Por último es importante

apuntar la posible presencia de más de una señal generadora de respuesta neuronal (Cragg, 1970).

1.5 REGENERACION NERVIOSA

En animales adultos, las neuronas del SNC son incapaces de entrar en ciclos mitóticos y por tanto dividirse y multiplicarse. Consecuentemente, cualquier lesión que cause muerte neuronal provoca cambios permanentes en la estructura del sistema nervioso. Estos cambios estructurales se suelen acompañar de alteraciones a largo plazo en las funciones de las áreas afectadas. Mientras que la muerte neuronal significa un hecho irreversible, la pérdida de segmentos axónicos es reversible en el SNP y, al parecer, en el SNC (Kelly, 1981).

Ramón y Cajal (1914) demostró que las fibras regeneradas presentes en un nervio, previamente seccionado, proceden de la porción proximal y no de la recuperación funcional de la porción distal del mismo. También fue Ramón y Cajal el primero en describir los patrones temporales y las características principales del proceso de regeneración axonal. Dicho proceso se pone en marcha de 6 a 30 horas después de la lesión. La latencia para la puesta en marcha del proceso regenerativo, así como la intensidad de éste, depende de los factores mencionados en el apartado 1.1. Por ejemplo, la latencia para la regeneración es notablemente

más corta en animales jóvenes que en viejos. En el extremo de la porción proximal del axón seccionado se constituye el denominado "cono de crecimiento", elemento fundamental para el inicio de la regeneración axonal y cuyas características ultraestructurales veremos más adelante. El avance hacia adelante del axón (cabo proximal) se debe a la elongación axonal desde el cono de crecimiento, así como a la aparición y elongación de colaterales en los nodos de Ranvier más próximos a la lesión. Estas prolongaciones alcanzan la zona de lesión al cabo de 24-48 horas, penetrando a través de ella entre el segundo y tercer día. El ritmo de crecimiento, a este nivel, está alrededor de 0,25 mm/día de tal manera que la invasión de la porción nerviosa distal por parte de los axones regenerados no ocurre hasta el décimo o quinceavo día. A partir de entonces, el ritmo de crecimiento es del orden de 2-4 mm/día, disminuyendo paulatinamente conforme aumenta la distancia del extremo axónico respecto del soma neuronal (Sunderland, 1978) (figura 6).

La aplicación de diversas técnicas (estimulación eléctrica, test de actividad para la demostración de reinervación de las fibras musculares, marcaje radioactivo del axón regenerado, etc.) al estudio de los patrones temporales de regeneración nerviosa han confirmado los hallazgos arriba reseñados obtenidos por Ramón y Cajal (Krasne y Lee, 1977; Grafstein y McQuarrie, 1978; Selzer, 1980; Golberger y Murray, 1982; McQuarrie, 1983; Yin y

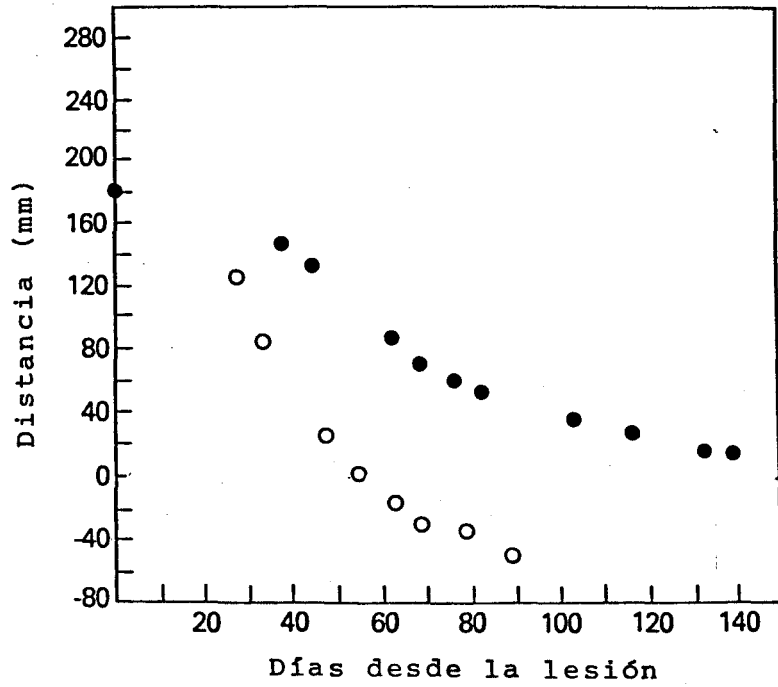


Figura 6.- Disminución en la velocidad de regeneración del nervio mediano (círculos blancos) y del nervio ulnar (círculos negros) conforme aumenta la distancia del soma neuronal. (Tomada de Sunderland, 1978).

Selzer, 1984).

Otro principio, enunciado por Ramón y Cajal y ampliamente confirmado en nuestros días (Mizumo y col., 1980; Lisney, 1983 a y b; Rhoades y col., 1983), es que la velocidad y la eficacia del proceso de regeneración aumenta conforme la lesión supone menor interrupción en la vía nerviosa. En este sentido, la regeneración de nervios aplastados es más fácil que la de aquellos sometidos a axotomía. Las razones de este hecho no son bien conocidas. Se sospecha que la presencia de tubo endoneural facilita la regeneración (Lundborg y col., 1982; Medinacelli y Freed, 1983). Con el aplastamiento se desconecta la vía axónica pero no la continuidad del nervio con lo que la invasión del tubo endoneuronal ocupado previamente por los axones degenerados es más factible que con la axotomía.

La regeneración axonal se puede dividir en tres procesos: a) Formación del cono de crecimiento; b) Prolongación del cono de crecimiento y de las colaterales originadas desde él o desde los nodos de Ranvier próximos a la lesión en un fino axón que avanza hasta encontrar la célula blanco; y c) Maduración del axón hasta originar una fibra nerviosa de características similares a las previas a la lesión (McQuarrie, 1983). El cono de crecimiento es muy rico en retículo endoplásmico liso, neurotúbulos, neurofilamentos, mitocondrias, lisosomas y una amplia

variedad de elementos vacuolares. Los finos axones originados desde el cono de crecimiento presentan neurofilamentos y algunas estructuras membranosas. La tercera fase del proceso, la maduración, consiste en un progresivo aumento del diámetro del axón así como de su organización interna, es decir, ordenación de neurofibrillas y del retículo endoplásmico.

Durante el proceso de degeneración walleriana hay un gran aumento de células acompañantes del tejido nervioso cuya función es la degradación de restos axonales degenerados (Lubinska, 1982). En la actualidad ha ganado en importancia el papel que estas células juegan como elementos de sostén y guía para las fibras en proceso de regeneración (Torvik y Skjörten, 1971; Alberghina y col., 1984; Reisert y col., 1984). No se conocen los mecanismos que regulan el proceso de regeneración por parte de las células de Schwann, aunque se han propuesto varias hipótesis (Spencer y Weinberg, 1978). Conforme el axón avanza se pierden gran parte de las células acompañantes, surgidas durante el proceso degenerativo, hasta que, alrededor de tres semanas después de la regeneración, se consigue un número similar al existente en los nervios controles. Es importante mencionar que la composición bioquímica de las membranas de mielina regeneradas es diferente que la de las controles. Esta observación ha llevado a la conclusión de que el proceso de remielinización durante la regeneración nerviosa no

recapitula el de mielinización que ocurre en el desarrollo.

Las fibras amielínicas se regeneran de forma similar a las mielínicas, aunque el proceso mantiene ciertos aspectos peculiares. En el terminal axónico no aparece tan bien definido el cono de crecimiento. El proceso de regeneración comienza muy rápidamente, si bien la capacidad de avance axonal es de 1-2 mm/día. Por último, aparecen gran abundancia de brotes colaterales.

Es escasa la información disponible sobre los patrones temporales del proceso de regeneración nerviosa para el VI par craneal (Baker y col., 1981; Serra y col., 1982). Como método indirecto se ha seguido el comportamiento, en el animal despierto, de la población de motoneuronas del núcleo motor ocular externo, mediante el registro del potencial de campo, desde su axotomía hasta la reinervación del músculo ocular recto externo. Serra y col. (1982) han observado que el potencial de campo disminuye un 70-90% a los 3-10 días tras la lesión. Posteriormente, se recupera paulatinamente alcanzando unos valores próximos a los normales un mes después de la lesión (figura 7). La disminución del potencial de campo se relaciona con el descenso de excitabilidad de las motoneuronas de dicho núcleo (Delgado-García y col., 1978; Baker y col., 1981) y con la recuperación de ésta tras la reinervación (ver apartado 1.3).

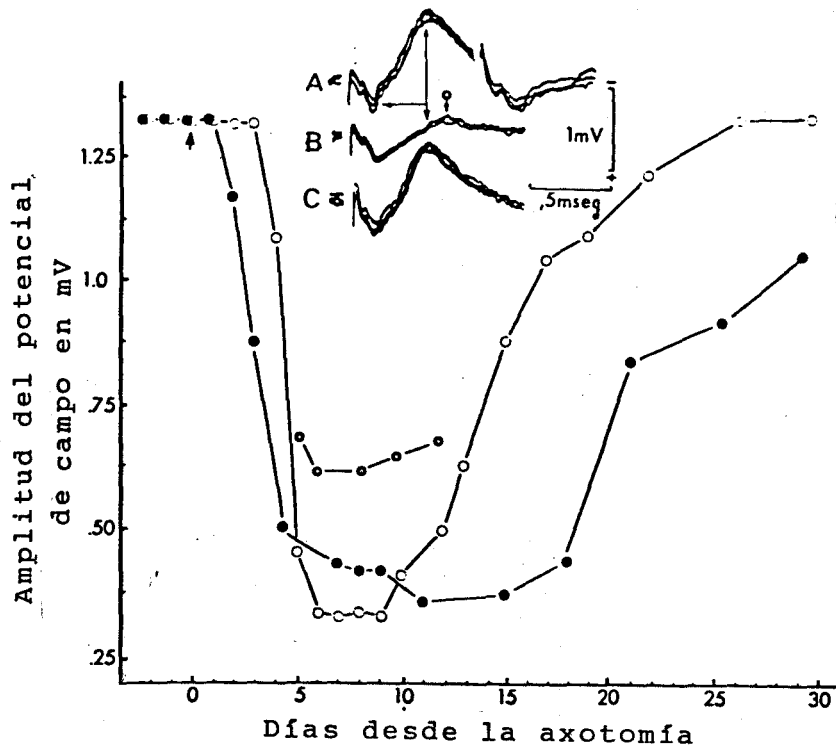


Figura 7.- Evolución de la amplitud del potencial de campo antidrómico del núcleo motor ocular externo tras la axotomía. A, amplitud del potencial de campo antidrómico control en el centro del núcleo; B y C, amplitud del potencial de campo antidrómico 10 y 25 días después de la axotomía del VI par craneal. Calibraciones como se indican. (Tomada de Baker y col, 1981).

Existen grandes diferencias en las características regenerativas de un nervio periférico mixto en vertebrados inferiores y mamíferos. En los primeros la regeneración suele ser organizada, debido a la reinervación preferencial de cada músculo por sus fibras nerviosas originales. Por el contrario, en los mamíferos la colateralización de las fibras hace imposible la reinervación adecuada de las células blanco (Sperry, 1945; Mizumo y col., 1980; Elizalde y col., 1983; Rhoades y col., 1983). La causa de estas diferencias no se conoce en la actualidad, se supone que las fibras nerviosas en mamíferos liberan una sustancia que inhibe la proliferación colateral de las fibras vecinas. Dicha sustancia estaría a su vez inhibida durante el proceso de regeneración, permitiendo así la invasión de las células musculares denervadas por los axones más próximos a ellas. Otro factor que interviene en el proceso de la regeneración es la distancia de la lesión a las células blanco. Cuanto mayor es la distancia mayor es la ramificación de los axones en el proceso de regeneración y menos probable es que alguno de ellos se aproxime a la célula blanco para que se pongan en marcha procesos específicos de reinervación.

La aparición de colaterales axónicas tiene como consecuencia el que una célula blanco pueda ser reinervada por más de un terminal axónico. Posteriormente, hay un

proceso de selección de la conexión adecuada. Este fenómeno se ha seguido con gran interés por la analogía que presenta con el desarrollo embriológico del sistema nervioso. En la actualidad se conoce poco acerca de los procesos específicos locales que hacen posible la correcta reinervación de las células blanco, aunque en concreto para el músculo se supone que dichas señales residen en la placa motora y/o en la membrana basal que reviste a la fibra muscular (Brown y col., 1981; Keynes y col., 1983; Lisney, 1983 a y b). En cualquier caso se acepta que las terminaciones axónicas que al cabo de un tiempo no hacen contacto con las células blanco degeneran, y mueren. En la figura 8A se muestra un resumen de los fenómenos relacionados con el crecimiento axónico y la identificación de las células blanco según que la axotomía sea distal o proximal. La figura 8B muestra la reinervación inespecífica de motoneuronas del hipogloso tras el proceso de regeneración nerviosa.

Existen, por último, dos grandes líneas de investigación relacionadas con los efectos de la lesión sobre el sistema nervioso que se describen sucintamente por estar al margen de los objetivos de este trabajo. La primera de ellas hace referencia a la capacidad del sistema nervioso para amoldarse a los daños irreversibles producidos por la lesión de una vía nerviosa o de un grupo de neuronas. La segunda línea se relaciona con los procedimientos clínicos dirigidos a favorecer los procesos

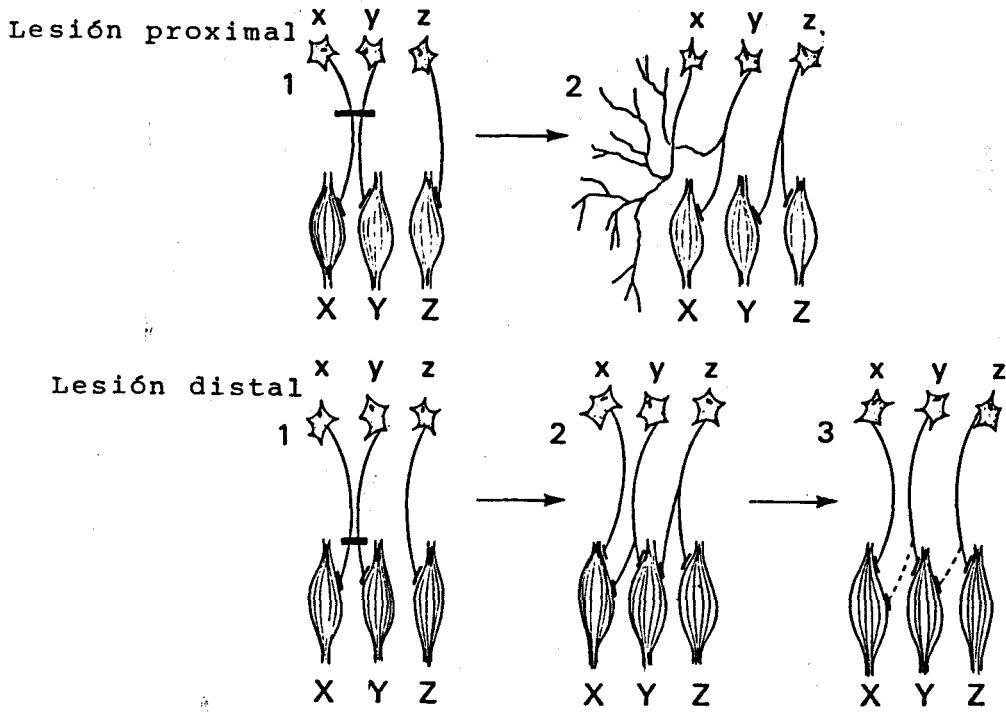


Figura 8 A.- Aparición de colaterales axónicas tras la axotomía proximal y distal. (Tomada de Selzer, 1980).

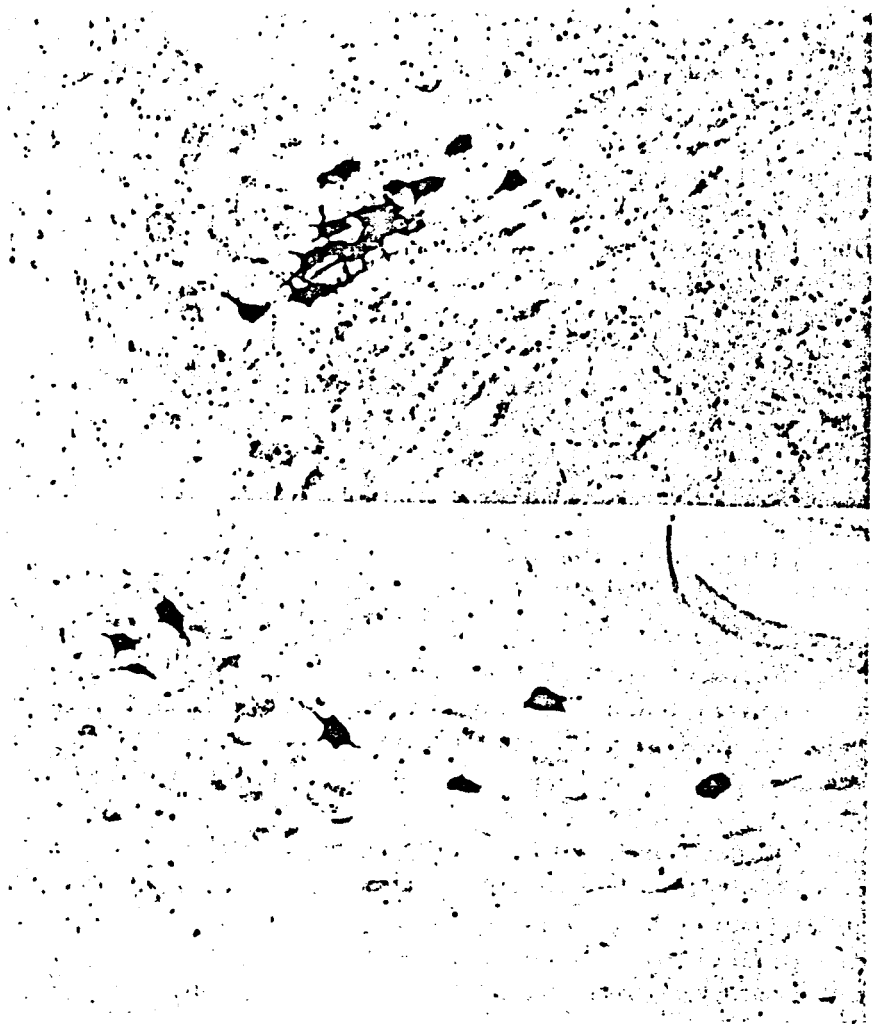


Figura 8 B.- Reinervación inespecífica de las motoneuronas del hipogloso. En la parte superior se muestra la distribución control de las motoneuronas, marcadas retrógradamente con el producto de reacción de la peroxidasa de rábano. En la parte inferior aparece el grupo de motoneuronas capaces de la reinervación. (Tomada de Mizumo y col., 1980).

regenerativos en el sistema nervioso central y periférico.

Generalmente se acepta que no hay regeneración de vías dentro del SNC (Clemente, 1964), o que cuando ocurre no tiene un carácter funcional (Barron, 1983). La ausencia de regeneración en el SNC ocasiona la aparición de diversos mecanismos que tienden a compensar las deficiencias de la vía afectada. Ejemplo de estos mecanismos son los cambios en la sensibilidad neuronal, la alteración de la eficacia sináptica, la aparición de rutas polisinápticas alternativas, etc. Dichas modificaciones enlazan con la remodelación del SNC durante el proceso de aprendizaje (Sperry, 1941; 1942; 1945; 1951; Tsukahara y Fujito, 1976; Brushart y Mesulam, 1980; Nelson y Mendell, 1979; Nelson y col., 1979; Brinkman y col., 1983; Cotman, 1983).

Existen numerosos factores mecánicos, físicos y químicos que facilitan el proceso de regeneración. Entre ellos, la implantación de tubos cilíndricos de silicona, la irradiación con rayos X, la estimulación eléctrica de los nervios en periodo de regeneración, el aumento de temperatura, la aplicación del factor de crecimiento nervioso, los cambios en las condiciones iónicas, etc. Estos factores actúan evitando la formación del tapón de glia o bien como neurotróficos acelerando la velocidad de regeneración (Levi-Montalcini y Calissano, 1979; Lundborg y col., 1982; Love, 1983; Medinacelli y Freed, 1983;

Medinacelli y col., 1983 a y b; Nix y Hopt, 1983). Normalmente estos factores se usan en conjunción con técnicas quirúrgicas. De acuerdo con su eficacia, de entre los métodos para la regeneración en el SNP se puede destacar el que consiste en introducir los cabos proximales y distales en cámaras de silicona, en sustitución de las vainas endoneurales. El método que más clásicamente se ha utilizado es el de la aposición y sutura quirúrgica. La utilización de injertos, es decir, de trozos de nervios extraídos de otro lugar diferente al de la lesión, parece ser la técnica de resultados más deficientes. Recientemente, se está revalorando la posibilidad de regenerar vías en el SNC por la introducción de injertos de tejido embrionario (Tsuge, 1980; Chi y Dahl, 1983; Crumley y San Francisco, 1983; Gage y col., 1983/4; Schmidt y col., 1983).

1.6 MODELO EXPERIMENTAL ELEGIDO

Como modelo experimental para este trabajo se ha elegido el núcleo motor ocular externo del gato. Este núcleo constituye un ejemplo adecuado de centro motor superior, en mamíferos, en el que se pueden evaluar las modificaciones morfofuncionales provocadas por la axotomía y el proceso de regeneración. Las características especiales de este núcleo, y en general del sistema oculomotor, que han llevado a elegirlo como modelo experimental, se pueden resumir como sigue:

a) Fácil medida y calibración de los movimientos oculares en el animal despierto, lo cual ha permitido cuantificar los efectos motores de las lesiones y el grado de recuperación funcional tras la reinervación

b) Las motoneuronas del núcleo motor ocular externo envían sus axones por un nervio exclusivamente motor, el VI par craneal. Esta característica evita los problemas de deaferentización que aparecen en nervios espinales mixtos.

c) Las motoneuronas del núcleo motor ocular externo inervan casi exclusivamente el músculo extraocular recto externo; sólo un pequeño porcentaje de axones envían

colaterales hasta el músculo retractor bulbi. Este hecho facilita la correlación entre la actividad neuronal y la motilidad ocular, así como la determinación precisa de los efectos funcionales inducidos por la axotomía.

d) Las motoneuronas del núcleo motor ocular externo se conocen bien desde el punto de vista morfológico, electrofisiológico y neurofisiológico por lo que los efectos producidos por la axotomía se pueden cuantificar con facilidad.

e) Las motoneuronas del núcleo ocular motor externo poseen entradas sinápticas excitadoras e inhibitoras de origen conocido desde el punto de vista morfológico y electrofisiológico.

f) La actividad de las motoneuronas del núcleo motor ocular externo, tanto controles como axotomizadas, se puede registrar, con cierta facilidad, en el animal despierto.

g) Por último, las alteraciones provocadas en las motoneuronas del núcleo motor ocular externo por la lesión pueden servir como modelo experimental, para el estudio de algunos síndromes neurológicos de la actividad motora ocular. Por otro lado, este modelo es utilizable también en el estudio de la plasticidad neuronal en el sistema nervioso.

Las motoneuronas del núcleo motor ocular externo se han estudiado en detalle por morfólogos, neurofisiólogos y especialistas en teoría de sistemas. En las páginas siguientes (apartados 1.8 y 1.9) se resumen las características fundamentales de este grupo neuronal, dedicando especial interés a aquellos datos más relacionados con el presente trabajo.

1.7 MOVIMIENTOS OCULARES

La función de los movimientos oculares es proyectar la imagen de un objeto sobre la retina. La presencia de zonas especializadas en la retina hace necesario que los movimientos oculares sean de gran precisión (Robinson, 1968). Aunque el gato carece de fovea, posee una región central de la retina con mayor densidad de conos, por lo que los movimientos oculares tienden a proyectar las imágenes visuales sobre esta zona especializada.

Los movimientos oculares se han dividido clásicamente en cinco tipos básicos (Robinson, 1968; Carpenter, 1977; Leigh y Zee, 1983): a) Movimientos de seguimiento; b) Movimientos rápidos (sacádicos); c) Movimientos de convergencia y divergencia; d) Movimientos reflejos compensatorios; y e) Movimientos en miniatura.

Los movimientos rápidos o sacádicos tienen como función llevar la imagen del objeto hacia la fovea retiniana. Durante reflejos compensatorios de seguimiento su latencia es de unos 200 msec. Estos movimientos son de gran velocidad ($> 100^\circ/\text{seg}$), llegando hasta $800^\circ/\text{seg}$ en el hombre

y $200^\circ/\text{seg}$ en el gato. Durante el movimiento parece que no es posible la percepción visual. Este tipo de movimiento puede ser voluntario o bien inducido por un reflejo compensatorio de origen visual y/o vestibular.

En la actualidad se conocen algunas de las estructuras relacionadas con la generación de movimientos sacádicos, así como sus patrones de actividad (Fuchs y Kaneko, 1981; Kaneko y col., 1981; Robinson, 1981).

Dentro de los reflejos compensatorios se consideran dos clases diferentes, el vestibular y el optocinético. Estos reflejos constan de dos fases: una lenta, de seguimiento, y otra rápida, compensatoria. La fase rápida tiene las características mencionadas para los movimientos sacádicos. La fase de seguimiento se caracteriza por presentar una latencia corta, baja velocidad ($20-30^\circ/\text{seg}$) y visión continua durante el movimiento. En el reflejo vestíbulo ocular los ojos se mueven con velocidad igual pero en sentido contrario al movimiento de la cabeza (fase lenta); esto hace que la posición de la mirada (que es equivalente a la posición de la cabeza más la ocular) permanezca estable. Cuando el ojo alcanza el límite anatómico de la órbita vuelve al centro de ésta con un movimiento rápido, tomando una nueva referencia según la cual seguir el reflejo compensatorio. Al igual que para el movimiento sacádico también se conocen con bastante detalle

las estructuras que participan en el reflejo vestibulo ocular, así como las señales que codifican cada una de ellas (Skavenski y Robinson, 1973; Shinoda y Yoshida, 1974; Gómez y Delgado-García, 1984).

Existen numerosas descripciones de las características del resto de los movimientos oculares reseñados más arriba (Carpenter, 1977). Sin embargo, al no estar específicamente relacionadas con este trabajo no se mencionan aquí.

1.8 CONSIDERACIONES MORFOFUNCIONALES DE LAS MOTONEURONAS DEL NUCLEO MOTOR OCULAR EXTERNO

El núcleo motor ocular externo se localiza en la región dorso-medial de la protuberancia, a 1 mm del suelo del IV ventrículo y se extiende longitudinalmente 1,2 mm, entre los planos 6 y 7,2 de atlas de Berman, a ambos lados de la línea media (Ramón y Cajal, 1911; Berman, 1968; Baker y col., 1969; Graybiel y Hartweg, 1974). Forma junto con la rodilla del facial, estructura bajo la que se localiza, la denominada eminencia del motor ocular externo (eminenciae abducentis) o eminencia facial (colliculo facialis) (Truex y col., 1976).

Al conjunto de neuronas que forma el núcleo del motor ocular externo se las ha considerado, inicialmente, como motoneuronas (Ramón y Cajal, 1911; Lorente de Nó, 1933). No obstante, mediante diferentes tipos de técnicas se han detectado, además, grupos neuronales que proyectan dentro del SNC (Baker y Highstein, 1975; Graybiel y Hartweg, 1974; Delgado-García y col., 1977), lo cual ha determinado que este núcleo no pueda ser considerado como exclusivamente motor.

El núcleo del motor ocular externo está constituido por unas 2000 ± 100 neuronas, de las cuales un

60% proyectan sus axones a través del VI par craneal considerándose las como motoneuronas. Alrededor del 30% de las neuronas conectan, a través del fascículo longitudinal medial, con el núcleo del motor ocular común contralateral y se las denomina interneuronas internucleares. El 10% restante está formado por neuronas de las que se desconoce sus puntos de proyección (Steiger y Buttner-Ennever, 1978).

Las motoneuronas se distribuyen uniformemente a lo largo del núcleo motor ocular externo. Presentan formas variables fusiformes, esféricas, piramidales y multipolares, siendo estas últimas las más abundantes. Las primeras se localizan principalmente en las proximidades de la rodilla del facial. Las dimensiones del soma celular (tomando el valor medio de los diámetros mayor y menor) oscilan entre 15 y 30 μm , siendo la media de 25 μm y la desviación típica respecto de ella de 0,5. Las descripciones recientes de los árboles dendríticos para las motoneuronas, realizadas mediante inyección intracelular de peroxidasa de rábano (Highstein y col., 1982), coinciden con las realizadas, mediante impregnación argéntica por Ramón y Cajal (1911). Las motoneuronas presentan un número variable de dendritas primarias (entre 7 y 12) que se ramifican profusamente hasta salir de los límites anatómicos del núcleo. Los árboles dendríticos se orientan preferencialmente hacia tres áreas: los núcleos vestibulares, el fascículo longitudinal posterior y la formación reticular del puente.

Ultraestructuralmente las motoneuronas muestran en el soma un núcleo redondeado, de cromatina dispersa y un nucleolo. En la región perinuclear se localizan cisternas de retículo endoplásmico bien organizadas. El aparato de Golgi no es muy abundante. Finalmente, poseen gran número de pequeñas y elongadas mitocondrias así como de lisosomas. Sobre la membrana somática aparecen gran cantidad de botones sinápticos. En el axón se detecta la presencia de neurofilamentos de estructura altamente ordenada y de terminales sinápticos sobre el segmento inicial. Las terminaciones aferentes a la motoneurona, que hacen contacto sobre el segmento inicial, soma o dendritas poseen vesículas de aspecto esferoidal y arriñonado desconociéndose el neurotransmisor que incluyen (Destombes y Ripert, 1977; Spencer y Sterling, 1977).

Grantyn y Grantyn (1978) han descrito las características electrofisiológicas de las motoneuronas del núcleo motor ocular externo. Las propiedades pasivas y activas de las membranas en estas neuronas se resumen como sigue: la resistencia de entrada oscila en un rango de 1,2-4,8 M Ω , su velocidad de conducción oscila entre 25 y 84 m/seg, mientras el potencial de membrana varía de -50 a -60 mV, siendo 10,5 mV el valor medio de despolarización umbral. Finalmente, la duración del postpotencial hiperpolarizador es de 47 msec y su amplitud de 1,8 mV. Estos datos son

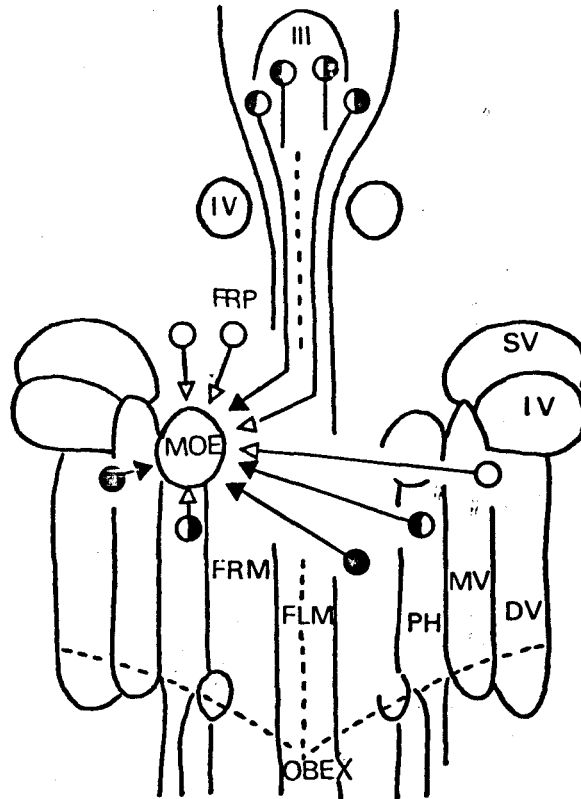
similares a los obtenidos en las motoneuronas α espinales (Coombs y col., 1959; Kernell, 1965; Richter y col., 1974). Esta coincidencia de resultados revelan una aparente contradicción. Por un lado, según Henneman y col. (1965) la excitabilidad neuronal está en relación inversa con el tamaño celular; por otro lado, las propiedades pasivas de las membranas están íntimamente relacionadas con los patrones morfométricos celulares (Rall, 1959; Grantyn y col., 1977). Uniendo estos dos principios, y debido a que las motoneuronas oculomotoras son más pequeñas y con mayor rango dinámico de producción de potenciales de acción que las α espinales, se pueden esperar amplias diferencias en las propiedades de membrana. Esta contradicción se resuelve si se acepta que las motoneuronas oculares poseen bajos valores en la resistencia específica de la membrana plasmática, parámetro aún no medido (Grantyn y Grantyn, 1978).

La actividad de una neurona depende de sus propiedades electrofisiológicas y de las entradas sinápticas que recibe. El uso de marcadores químicos y/o radioactivos que se transportan retrógrada o anterógradamente a través del axón, junto con los estudios fisiológicos que comportan el registro intra o extracelular de neuronas del núcleo tras la estimulación eléctrica en distintas áreas cerebrales o viceversa, han dado una idea bastante clara de las aferencias y eferencias del núcleo motor ocular externo. Las

aferencias a este núcleo son de origen vestibular, reticular, del núcleo prepositus hipoglossi y del núcleo motor ocular común (figura 9).

El núcleo motor ocular externo recibe aferencias desde los núcleos vestibulares homolateral y contralateral, las cuales tienen carácter inhibitor y excitador, respectivamente. La importancia relativa de estas aferencias no está completamente clara. Así, algunos autores mantienen que la vía homolateral implica cuantitativamente mayor número de células mientras que otros consideran que son similares (Baker y col., 1969; Maciewicz y col., 1977; Baker y Spencer, 1981; Porter y col., 1985) (figura 9). Además de la vía directa de origen vestibular, ya mencionada, se han detectado hasta tres rutas polisinápticas procedentes de los núcleos vestibulares que convergen finalmente en el núcleo motor ocular externo (Precht, 1979).

La fuente más importante de entradas sinápticas hasta el núcleo del motor ocular externo, junto con la vestibular, es la que proviene de la formación reticular. Al igual que en el caso anterior existen proyecciones desde áreas homolaterales y contralaterales, de carácter excitador e inhibitor, respectivamente (Hikosaka y col., 1977; Yoshida y col., 1979; Hikosaka y col., 1980; Baker y Spencer, 1981; Porter y col., 1985). Las células localizadas en esta región y relacionadas con los movimientos oculares se han



AFERENCIAS AL NUCLEO MOTOR OCULAR EXTERNO

				Densidad sináptica
Neuronas Vestibulares	Inhibidoras	Homolaterales	270 ++
"	"	Excitadoras	Contralaterales 210 ++
"	Reticulares	Inhibidoras	" 200 ++++
"	"	Excitadoras	Homolaterales	Medial-Dorsal.... 280 +++
			Lateral-Ventral..	150
"	Prepositus	Homolaterales	320 ++
		Contralaterales	680
"	Internucleares del nMOC*	Homolaterales	40 +++
		Contralaterales	680
"	"	supranMOC*	Homolaterales 60 +++
			Contralaterales 180

*nMOC (núcleo Motor Ocular Común)

Total.. 2510

Figura 9.- Diagramas (arriba) y cuantificación (abajo) de las vías aferentes al núcleo motor ocular externo. III, IV, núcleos motores de las pares craneales tercero y cuarto; FLM, fascículo longitudinal medial; FR, formación reticular; MOE, núcleo del motor ocular externo; PH, núcleo del preposición hipoglosa; SV, LV, MV y DV, son las regiones superior, lateral, medial y descendiente, respectivamente, del núcleo vestibular. (Tomada de Baker y Spencer, 1981).

caracterizado por sus patrones de descarga. Se pueden considerar cuatro tipos diferentes de actividad neuronal: a) Las células de pausa presentan un disparo sostenido para cualquier posición ocular salvo cuando hay un movimiento sacádico, periodo en el cual permanecen silentes; b) Las células de brote excitador se activan cuando el movimiento sacádico ocurre en la dirección de activación. Estas neuronas se localizan en la formación reticular homolateral al núcleo motor ocular externo; c) Las células de brote inhibitor se activan cuando el movimiento sacádico ocurre en la dirección de inactivación. Estas neuronas se localizan en la formación reticular contralateral al núcleo motor ocular externo; y d) Las células de brote-tónicas mantienen un patrón similar al de las motoneuronas. Las conexiones entre estas células han sido ampliamente estudiadas, al atribuírseles el papel de origen de los movimientos oculares espontáneos (Luschei y Fuchs, 1972; Kaneko y col., 1981; Van Gisbergen y col., 1981) (figura 10).

Otra vía de proyección aferente al núcleo motor ocular externo procede del núcleo prepositus hipoglosi (Maciewiz y col., 1977). La proyección contralateral es más densa que la homolateral, y no está claro si estas neuronas tienen carácter activador o inhibitor sobre las motoneuronas del núcleo motor ocular externo (McCrea y col., 1979). Sus células muestran un patrón de actividad del tipo de brote-tónico. Se desconoce, en la actualidad, cómo

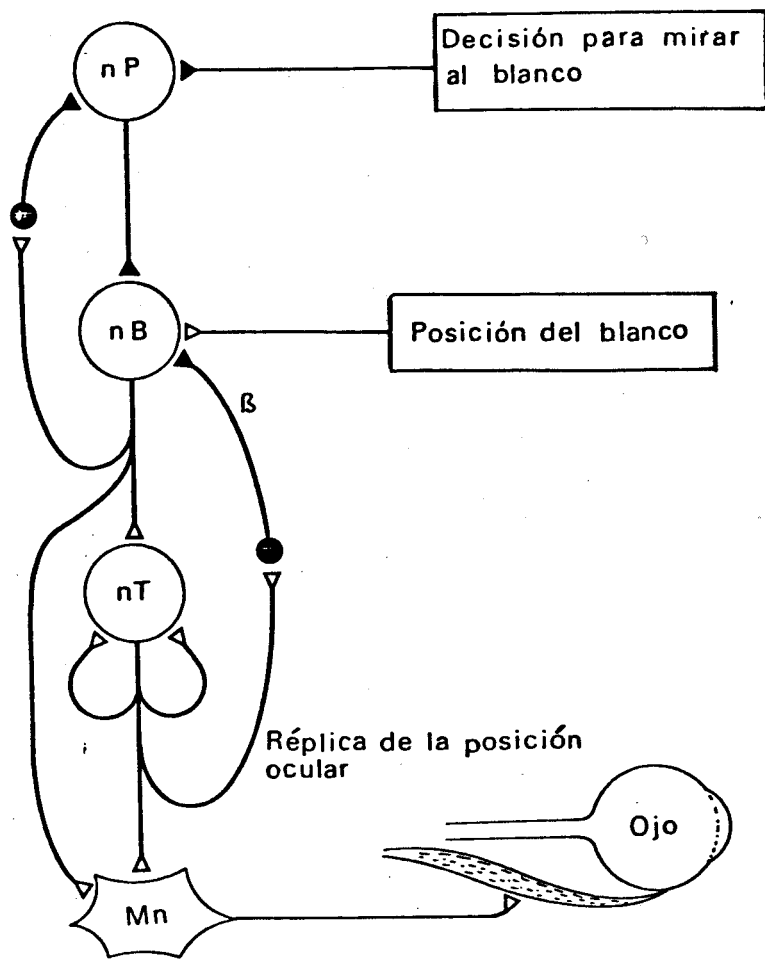


Figura 10.- Conexiones de las neuronas de pausa (nP), brote (nB) y tónicas (nT) de la formación reticular del puente, para la generación de la actividad en la motoneurona (Mn) que induce los movimientos oculares sacádicos, según el modelo propuesto por Robinson (1981).

interviene este núcleo en la generación de movimientos oculares (López-Barneo y col., 1982; Lannou y col., 1984; Delgado-García y col., 1985 a).

El último grupo de aferencias al núcleo motor ocular externo proviene del núcleo motor ocular común y, desde el punto de vista cuantitativo, es la menos importante. Esta proyección es bilateral y ambas son aproximadamente igual en número (Maciewicz y Phipps, 1983). Hay evidencias suficientes para sugerir que esta vía eferente está relacionada principalmente con los movimientos oculares de vergencia (Delgado-García y col., 1977; Mays, 1984).

El estudio neurofisiológico de los núcleos motores oculares se inició en los años sesenta, orientándose al análisis cualitativo de la conducta motoneuronal durante el reflejo vestibulo ocular. Tales trabajos se realizaron en animales espinales o anestesiados, lo que limitó la variedad, amplitud y velocidad de los movimientos oculares en relación a sus patrones de conducta neuronal (Tyc-Dumont y Dell, 1961; Bertrand y col., 1966; Precht y col., 1969). La técnica de registro unitario extracelular en el animal despierto (Evarts, 1968) ha permitido un rápido avance en la investigación de este campo. La actividad en la motoneurona depende de la posición ocular (Fuchs y Luschei, 1970; Robinson, 1970; Schiller, 1970; Henn y Cohen, 1972). Así

por ejemplo, la frecuencia de descarga de las motoneuronas aumenta cuando el animal mueve los ojos homolateralmente, en la dirección denominada de activación. Por el contrario la frecuencia disminuye cuando los ojos se dirigen contralateralmente, en la dirección de inactivación.

En base a estos estudios cualitativos, Robinson (1970) definió la relación matemática que indica la frecuencia instantánea (F) de disparo de las motoneuronas del núcleo motor ocular externo.

$$F = F_0 + kP + r\dot{P}$$

Donde F_0 es la frecuencia de disparo cuando el ojo está en el centro de la órbita, k y r son dos constantes de proporcionalidad específicas de cada neurona, que indican la sensibilidad a la posición (P) y a la velocidad (\dot{P}) ocular. El producto $r\dot{P}$ es igual a cero durante fijaciones oculares y tanto kP como $r\dot{P}$ pueden tener valores negativos para fijaciones y/o movimientos en la dirección de inactivación.

La ecuación anterior define la conducta motoneuronal durante la estimulación de origen visual. Posteriormente, se ha comprobado (Skavenski y Robinson, 1973) que dicha ecuación es también válida para la estimulación de origen vestibular. Durante el reflejo vestibulo ocular los canales semicirculares recogen la

información referente a la aceleración de la cabeza. Para transformar esta aceleración en posición ocular debe haber una doble integración. Las neuronas vestibulares de primer orden portan información referente a la velocidad de la cabeza, por lo cual la señal se desfasa 90° con respecto a la posición de la cabeza y del ojo (Fernandez y Golberg, 1971). Dado que la mecánica ocular es incapaz de realizar, por sí sola, la segunda integral, esta debe ser hecha entre las neuronas vestibulares de segundo orden y las motoneuronas del núcleo motor ocular externo, de tal manera que la frecuencia de disparo en estas neuronas tiene un desfase inferior a 90° (Skavenski y Robinson, 1973; Gómez y Delgado-García, 1984).

La figura 11 (Baker y Spencer, 1981) muestra las diferentes pautas de conducta de las motoneuronas del núcleo motor ocular externo durante diversas situaciones experimentales (fijaciones, movimientos sacádicos y reflejo vestibulo ocular), así como de la actividad de las principales aferencias que proyectan monosinápticamente sobre dichas motoneuronas.

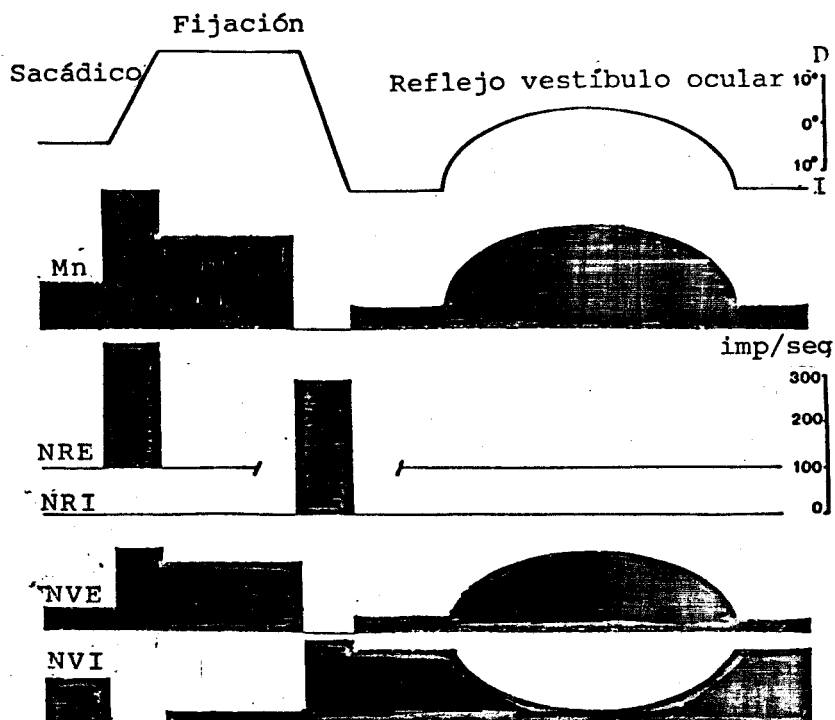


Figura 11.- Actividad de una motoneurona (Mn) del núcleo motor ocular externo durante fijaciones y movimientos oculares de tipo sacádico o vestibular. En el diagrama se muestra la actividad de las neuronas de la formación reticular excitadoras e inhibidoras (NRE y NRI) y la de los núcleos vestibulares (NVE y NVI). (Tomada de Baker y Spencer, 1981).

2 OBJETIVOS DEL TRABAJO

El presente trabajo de investigación se ha centrado en cubrir los siguientes objetivos experimentales:

a) Caracterizar los patrones morfométricos y citoarquitectónicos de la población de motoneuronas del núcleo motor ocular externo que, tras la axotomía, regeneran sus axones hasta reinervar el músculo recto externo. Para ello se utilizó la técnica del marcaje neuronal retrógrado mediante la inyección de peroxidasa de rábano en el músculo recto externo control y denervado. El estudio se realizó dos meses después de practicada la axotomía a nivel de la órbita ocular del VI par craneal.

Como paso previo y para cubrir este objetivo se puso a punto, en nuestro laboratorio, la técnica de marcaje neuronal retrógrado mediante la enzima peroxidasa. Para ello se realizó una evaluación sistematizada de todas las variantes a la técnica descrita en los últimos años.

b) Estudiar la actividad eléctrica de las motoneuronas del núcleo motor ocular externo controles y axotomizadas durante distintos tipos de movimientos oculares, en el gato despierto e intacto. Concretamente se estudió la evolución de la conducta de las motoneuronas hasta un año después de realizada la lesión. Con este fin, se registró la actividad extracelular de motoneuronas controles y axotomizadas durante fijaciones oculares, así como durante

movimientos oculares sacádicos voluntarios o inducidos por estimulación vestibular o visual. Sólo se registraron y analizaron aquellas motoneuronas identificadas mediante su activación antidrómica desde el nervio del VI par craneal homolateral.

Con objeto de determinar la eficacia de la lesión y/o del grado de reinervación se realizaron registros oculares tanto en el ojo control como en el lesionado.

c) Análizar los datos registrados tanto de motoneuronas controles como axotomizadas con el propósito de establecer relaciones entre: a) Posición del ojo en la órbita y actividad de las motoneuronas; b) Frecuencia instantánea de disparo durante movimientos oculares sacádicos y la frecuencia máxima de disparo neuronal o velocidad máxima ocular durante dichos movimientos; c) Fase de la frecuencia de disparo en la motoneurona frente a la fase de la posición ocular durante estimulación de origen vestibular.

3 MATERIAL Y METODOS

3.1 TECNICAS HISTOLOGICAS

3.1.1 CASUISTICA

Para la realización de los experimentos histológicos se utilizaron 10 gatos con pesos comprendidos entre 1,5 y 2 Kg.

3.1.2 PROCESAMIENTO DE LOS ANIMALES. METODICA DE LA INYECCION DE LA PEROXIDASA DE RABANO

Veinticuatro horas antes de la operación, el animal se sometió a un ayuno de sólidos, con objeto de evitar complicaciones inducidas por la anestesia. Por otra parte, el material quirúrgico se esterilizó sumergiéndolo, durante el mismo periodo de tiempo en una solución de Armil al 0,1%.

Como anestésico se utilizó ketamina i.m. (Ketolar, 35 mg/Kg de peso). Previamente a la anestesia se administró una dosis de atropina i.m. al 0,5% (1ml/1 Kg de peso) para evitar que un exceso de secrecciones bronquiales produjese alteraciones durante la operación.

Una vez anestesiado, el animal se colocó en la mesa de operaciones sobre una manta térmica, con objeto de mantener su temperatura dentro de un margen adecuado

($38^{\circ}\pm 0.5$) lo que se controló mediante un termómetro rectal. Seguidamente se afeitaron y lavaron las zonas quirúrgicas para minimizar la posibilidad de infección y facilitar el proceso operatorio. Finalmente se fijó la cabeza del animal en un instrumento estereotáxico para favorecer el abordaje experimental.

Los animales seleccionados se destinaron a estudiar, en el orden que se indica, los siguientes objetivos experimentales: a) Variantes en la técnica peroxidasa de rábano; b) Identificación de los tipos neuronales del núcleo motor ocular externo; y c) Efectos de la axotomía a nivel de la órbita ocular del VI par craneal. No obstante los diferentes grupos experimentales y dado que siempre se usó como modelo el músculo recto externo y el núcleo del motor ocular externo, el abordaje quirúrgico fue similar en todos los casos.

Para marcar las motoneuronas del núcleo motor ocular externo, se practicó una incisión en la piel periorbitaria a nivel del músculo recto externo. Seguidamente se separó la conjuntiva ocular, desinsertándose el músculo recto externo del globo ocular, con el fin de abordar desde su cara interna el nervio del VI par craneal (figura 12). Para alcanzar la unión neuromuscular con mayor facilidad se extrajo el líquido de la cámara anterior ocular con la ayuda de una jeringa estéril. Finalmente, bajo un microscopio de

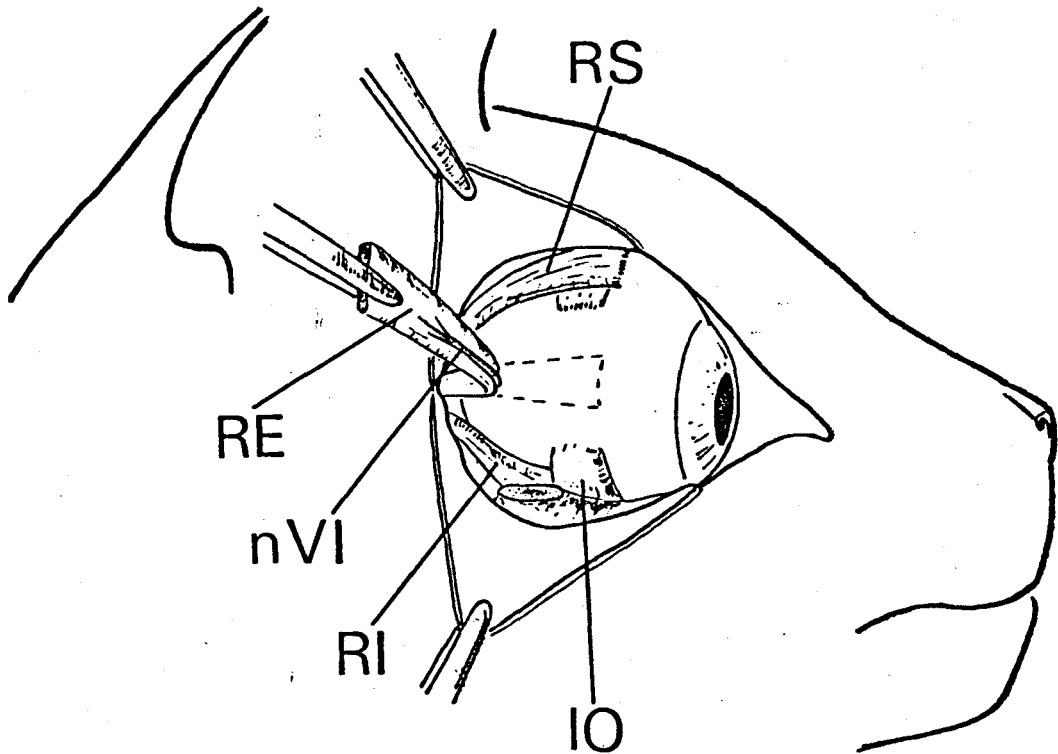


Figura 12.- Representación mostrando el abordaje quirúrgico del nervio del VI par craneal (nVI). RE, RI y RS, rectos externo, inferior y superior, respectivamente; IO, oblicuo inferior.

disección Olympus, se inyectaron, a la entrada del VI par en el músculo, de 30-40 μ l de peroxidasa de rábano (Sigma tipo VI) al 50% en dimetilsulfóxido (Keefer, 1978).

En el grupo experimental el núcleo motor ocular externo se abordó de forma similar a la descrita. Una vez localizada la unión neuromuscular se procedió a cortar el nervio 1 mm antes de su entrada en el músculo. Dos meses después se inyectó la peroxidasa de rábano en el músculo ya reinervado.

Cuando se trató de marcar las interneuronas del núcleo motor ocular externo se comenzó la operación con una incisión antero posterior de la piel de la cabeza del animal, siguiendo la sutura sagital. Una vez rechazado a ambos lados el tejido subyacente, con la ayuda de un craneotomo, quedó descubierta la superficie craneana. A continuación se realizó un pequeño orificio (2-3 mm de diámetro) mediante un torno de dentista Kavo. Finalmente se inyectó 1 μ l de peroxidasa de rábano a nivel del núcleo del motor ocular común (coordenadas: 3,75 mm anterior, 1,5 mm lateral y 24 mm de profundidad a partir de la superficie cerebral, Berman, 1968).

Todos los pasos descritos se realizaron en un acto quirúrgico que duró, aproximadamente, una hora. La fase final del mismo consistió en cerrar la herida con puntos de

sutura y protegerla con una nebulización de Veterín-fenicol. Por último, se inyectó preventivamente penicilina-G sódica (100.000 u.i.), con objeto de evitar procesos infecciosos.

Tras la operación, el animal se colocó en una habitación climatizada a 28°C y, durante el tiempo que duró el efecto del anestésico, se le cambió de postura varias veces al objeto de evitar edemas pulmonares y neumonías por decúbito. Las zonas operadas se limpiaron cada día, durante el tiempo de supervivencia del animal, con gasas estériles y se les puso Blastoestimulina en pomada, que presenta acción germicida y facilita la regeneración del tejido.

3.1.3 PROCESAMIENTO DE LOS CEREBROS. FIJACION Y TECNICAS HISTOQUIMICAS

Tras un periodo de supervivencia variable (24 horas para el marcaje de las interneuronas, 42-48 horas para el marcaje de las motoneuronas controles y axotomizadas) se procedió a la perfusión intracardiaca de los animales bajo anestesia barbitúrica profunda, inyectando intraperitonealmente pentobarbital sódico (Nembutal) a la dosis de 50 mg/kg de peso.

Para la perfusión intracardiaca se abrió la caja torácica y se separó el pericardio. Seguidamente, se

seccionó el ápice del ventrículo izquierdo y se introdujo una cánula rígida a la que se ajustaron las jeringas utilizadas para realizar la perfusión en la aorta ascendente. Inmediatamente después se sujetó la cánula con una pinza plana para facilitar la evacuación del fluido.

Para la preparación del líquido de perfusión se utilizó el método inicial de Karnovsky (1965). El líquido utilizado fue una mezcla de dos fijadores, paraformaldehído al 1% (Paraformaldehído, Merck) en una solución de tampón fosfato (pH 7,4) (Fosfato monosódico hidratado-fosfato disódico) 0,1M. La mezcla se preparó partiendo de 500 ml de agua destilada a la que se añadieron 20 g de paraformaldehído y de 4 a 8 gotas de hidróxido sódico 1N; una vez disuelto se añadieron 80 ml de glutaraldehído al 25%, 460 ml de tampón fosfato (pH 7,4) y agua destilada hasta completar 3.000 ml.

La perfusión se hizo según los siguientes pasos: en primer lugar se realizó un lavado con suero salino (cloruro sódico al 0,9%) hasta limpiar de eritrocitos el tejido cerebral (500 ml). Seguidamente se inyectó la solución fijador (1.500 ml). Para los animales que se procesaron según el método de la diaminobenzidina la perfusión acabó en este paso. Por último, se pasó una solución de sacarosa al 10% en tampón fosfato 0,1M.

Terminada la perfusión del animal, se extrajo el cerebro, separando el tronco del encéfalo e introduciéndolo en tampón fosfato con sacarosa al 10% durante 15 horas. Antes de proceder a seccionar coronalmente el tronco del encéfalo, se escogió de éste un bloque de unos 2 cm, alrededor de los pedúnculos cerebelosos.

Las secciones coronales y sagitales se realizaron con la ayuda de microtomo de congelación Reichert-Jung mod. 1205 o con un vibratomo Lancer serie 1000, graduados a 50 μ m. Los cortes se recogieron seriados y ordenados en tampón fosfato (pH 7,4) 0,1M, donde pueden permanecer hasta una semana sin deterioro de la actividad enzimática, o en solución de recogida (Mesulam, 1982). Para la recogida de los cortes se dispusieron bandejas de plástico divididas en 25 compartimientos y agujereados en su base a modo de colador, de manera que se pasó la bandeja a los diferentes medios de incubación. A continuación se lavaron en tres pasos con agua destilada y posteriormente se introdujeron en el medio de incubación, que se preparó antes de usarlo, mezclando la siguientes soluciones:

Solución A: nitroferricianuro sódico (Sigma) disuelto en agua destilada (300 mg en 277,5 ml de agua) al que se añadió 15 ml de tampón acetato 0,2M (pH 3,3).

Solución B: conteniendo el sustrato oxidable para la reacción enzimática, la tetrametilbenzidina (TMB, Sigma) en solución saturada de alcohol absoluto (7,5 ml); para

llegar a disolverla se necesitó agitar y calentar ligeramente.

El periodo de incubación fue de 20 minutos en agitación suave, pasados los cuales se añadieron 7,5 ml de peróxido de hidrógeno al 0,3% y se continuó en agitación por otros 20 minutos. En los casos en los que se utilizó el método de la glucosa oxidasa como promotor de la reacción, el protocolo fue idéntico salvo que, en vez de peróxido de hidrógeno se empleó una mezcla de los siguientes productos: Beta-d glucosa (Sigma) 200 mg, cloruro de amonio (NH_4Cl) (Merck) 40 mg, glucosa oxidasa 0,3 mg, por cada 100 ml de medio. El periodo de incubación osciló entre 90 y 120 minutos y se realizó en estufa a 37°C. Finalizada la incubación se sometió el tejido a repetidos lavados en tampón fosfato (pH 7,4) 0,1M. Terminado el proceso se procedió a montar los cortes en portas preparados con gelatina y sulfato crómico potásico.

Con aquellas secciones de tejido que se procesaron utilizando la diaminobenzidina como cromógeno se siguió un protocolo distinto a partir de la perfusión con Karnovsky. Una vez extraído el tronco del encéfalo se introdujo en una solución de fijador, similar a la que se usó en la perfusión, durante 6 horas. Después el tronco del encéfalo se llevó a una solución de tampón Tris (pH 7,6) con sacarosa al 30%, permaneciendo a -4°C hasta que la pieza se depositó

en el fondo del recipiente. Las secciones de 50 μm se recogieron en tampón Tris (pH 7,6). A continuación se pasaron a la solución de incubación con el cromógeno, 250 mg de diaminobenzidina tetrahidroclórica (DAB, Sigma) en 50 ml de tampón Tris. El periodo de incubación fue de 30 minutos en la estufa a 37°C, pasados los cuales se añadió peróxido de hidrógeno o glucosa oxidasa. Al igual que en el caso anterior, las secciones se mantuvieron durante 20 ó 120 minutos, respectivamente, en las condiciones descritas para la tetrametilbenzidina. Finalmente las secciones se lavaron repetidamente en tampón Tris y se montaron en portas gelatinados.

Cuando se utilizó cloruro de cobalto (Adams, 1977) como factor coadyugante de la reacción de la diaminobenzidina, este producto se disolvió al 0,5% en tampón Tris sumergiéndose en él las secciones recién cortadas durante 10 minutos. Posteriormente se lavaron tres veces en tampón Tris (15 minutos) y se continuó con el protocolo de la diaminobenzidina.

Durante el montaje de los cortes histológicos se hicieron dos series paralelas, A y B. Ambas series se dejaron sin cubrir hasta el día siguiente para su deshidratación. En la serie A se completó la deshidratación con dos breves pasos por alcohol absoluto y

dos pasos en xilol y se cubrieron con DPX. La serie B se utilizó como referencia para localizar los núcleos ya que se le realizó una contratinción en rojo neutro (1%).

3.1.3.1 VARIANTES APLICADAS A LA TECNICA DE LA PEROXIDASA DE RABANO

Al protocolo antes descrito de la reacción de la peroxidasa de rábano se le realizaron diferentes modificaciones. Estas se hicieron con el fin de evitar la presencia de productos de la reacción inespecíficos o bien de mejorar la sensibilidad de la misma. Las variantes que se probaron (ver tablas I y II) afectan a la eficacia de la reacción, según diferentes autores (Itoh y col., 1979; Mesulam, 1982; Pásaro y col., 1983; Weber y Kalil, 1983). Para evitar la presencia de productos de reacción inespecíficos se usaron las variantes siguientes: a) Cambio en la concentración de nitroferricianuro sódico de la parte (A) de la mezcla. Concretamente, se pusieron cantidades crecientes 10, 30, 100 y 300 mg; b) Introducción de un baño de solución estabilizadora, que consistió en una mezcla de nitroferricianuro sódico 9 g, tampón acetato (pH 3,3) 5 ml, alcohol absoluto 50 ml y agua destilada 45 ml. Las secciones se introdujeron en este baño una vez revelada la actividad enzimática; y c) Filtración. Esta modificación consistió en filtrar la parte (A) de la mezcla, previamente a la introducción de los cortes en ella. En ocasiones

se utilizó el sistema de filtrado para el preparado de diaminobenzidina. El segundo grupo de variantes se aplicó para mejorar la eficacia de la técnica en el marcaje de neuronas. En este sentido se utilizaron dos variantes: a) Glucosa oxidasa como enzima dadora del poder de oxidación, en su reducción, de la glucosa en vez de peróxido de hidrógeno; y b) Cloruro de cobalto como coadyugante en el revelado de la diaminobenzidina; ambos métodos ya se describieron en el apartado anterior.

3.1.4 ESTUDIO DEL MATERIAL

Una vez comprobada la existencia de neuronas marcadas con el producto de reacción de la peroxidasa de rábano, se procedió al estudio particular de cada una de las secciones de tejido. Para ello se contaron y tomaron las medidas de los diámetros mayor y menor en todas las neuronas marcadas en el corte con la ayuda de una cámara clara acoplada al microscopio. La localización de cada neurona se facilitó al utilizar la serie B para identificar cada una de las estructuras troncoencefálicas colindantes.

Como microscopio se utilizó un Leitz - Dialux 20. Los dibujos de los cortes se ordenaron siguiendo los planos estereotáxicos de Horsley-Clarke de acuerdo con el atlas de Berman (1968).

3.2 TECNICAS ELECTROFISIOLÓGICAS

3.2.1 DISEÑO EXPERIMENTAL

El registro de la actividad de las motoneuronas del núcleo motor ocular externo se desarrolló según el diseño experimental que se muestra en la figura 13. Para ello se implantó un electrodo bipolar en la región proximal a la zona de lesión. El registro de la actividad eléctrica de las motoneuronas se realizó por vía transcerebelar, mediante microelectrodos de vidrio. La actividad en las motoneuronas se analizó en respuesta a estímulos de diferentes orígenes (eléctrico, vestibular y visual). Junto a la actividad de las motoneuronas se registró la conducta ocular (fijaciones o movimientos de los ojos). Todas las señales obtenidas se amplificaron y grabaron en una cinta magnética Hewlett Packard de 8 canales para su posterior análisis. Naturalmente, en las motoneuronas axotomizadas se procedió de forma similar, exceptuando la axotomía del nervio.

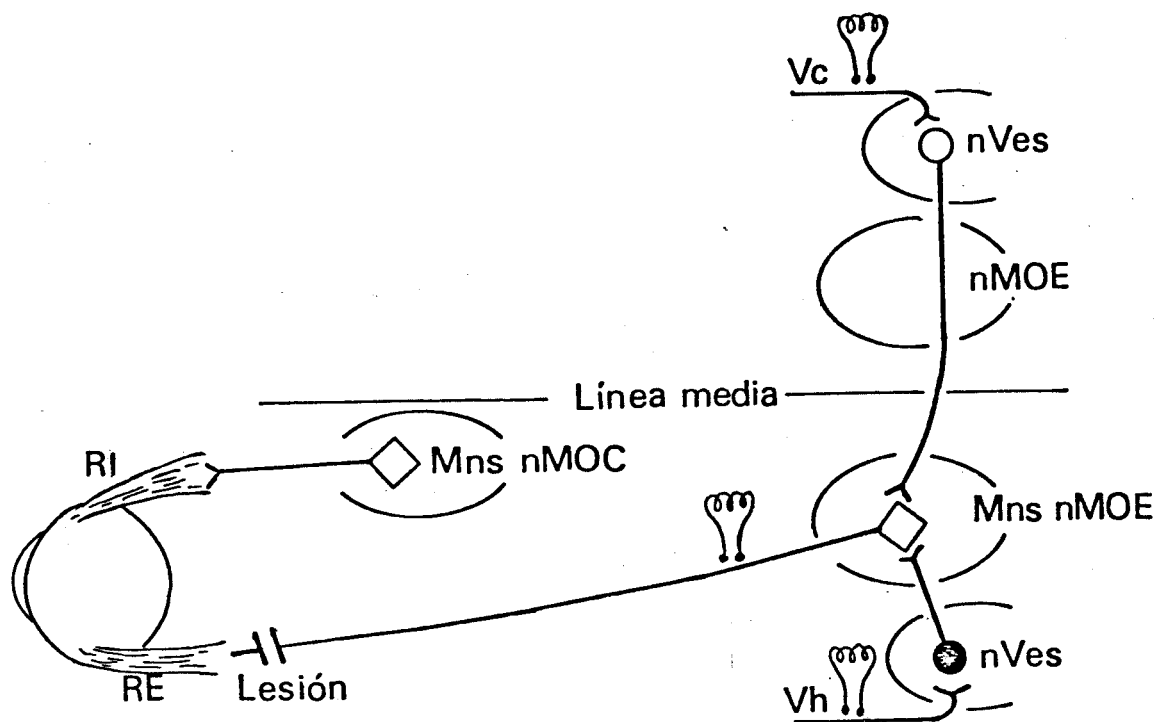


Figura 13.- Diseño experimental. MnsnMOC y MnsnMOE, motoneuronas del núcleo motor ocular común y externo respectivamente; nVes, núcleo vestibular; RE y RI, músculos recto externo e interno respectivamente; Vc y Vh, estimulación vestibular contralateral y homolateral respectivamente. Los símbolos rellenos significan entradas sinápticas inhibitorias.

3.2.2 CASUISTICA

Para la realización de los experimentos electrofisiológicos se utilizaron 10 gatos con pesos comprendidos entre 2 y 3,5 Kg. Debido a que los experimentos crónicos implican gran número de días o meses en la realización de los mismos, se prestaron especiales cuidados a los animales dedicados a este grupo experimental. Los animales se seleccionaron de entre aquellos que mostraron mayor docilidad y fortaleza física. Profilácticamente se les inyectó, a su llegada al laboratorio, penicilina G sódica (150.000 u.i./Kg). Quincenalmente, se le administró, por vía oral, 100 mg de vermífugos y se les inyectó 0,5 ml de un preparado polivitamínico.

3.2.3 PROCEDIMIENTO QUIRURGICO

Los animales se mantuvieron en ayunas durante las 24 horas previas a la intervención quirúrgica. Se anestesiaron con ketamina i.m. (Ketolar 35 mg/Kg de peso), administrándose dosis de 5 a 10 mg/Kg durante la intervención cuando el estado del animal así lo aconsejó. Antes de la anestesia se les administró atropina al 0,5% i.m. (1 ml/kg de peso).

Una vez anestesiado, el animal se colocó en la mesa de operaciones sobre una manta térmica y se fijó su cabeza a un aparato estereotáxico; a continuación, se lavaron y afeitaron las zonas quirúrgicas.

La intervención comenzó con una incisión antero-posterior en la piel de la cabeza, siguiendo la sutura sagital. Una vez rechazado a ambos lados el tejido subyacente y con la ayuda de un craneotomo, se liberó de inserciones aponeuróticas toda la zona craneal comprendida entre la fontanela bregmática y el foramen occipital. Una vez descubierta, la calota craneana se lavó cuidadosamente con suero fisiológico templado.

Se siguieron dos técnicas de lesión según la proximidad de ésta al soma neuronal: quirúrgica y electrolítica. La primera se realizó a nivel de la órbita tal y como se describió en el apartado 3.1.2.2. La segunda se realizó mediante un electrodo bipolar implantado a la salida del VI par del tronco de encéfalo. La localización se comprobó induciendo movimientos de abducción en el ojo homolateral. La lesión electrolítica se realizó pasando pulsos de corriente de 1 minuto de duración y de 2 mA de intensidad hasta que desapareció con el movimiento ocular.

Para la implantación de los electrodos de estimulación se practicaron en el cráneo dos orificios, con

la ayuda de un torno de dentista (Kavo). Por uno de los orificios se implantó un electrodo de estimulación en el nervio del motor ocular externo (lado izquierdo) a su salida del tronco del encéfalo, según las coordenadas estereotáxicas: 1,5 mm posterior, 3 mm lateral y 28 mm de profundidad a partir de la superficie cerebral (Berman, 1968). Este electrodo se situó inmediatamente anterior a la zona de lesión, cuando ésta se realizó a nivel central. Por el otro orificio se implantó un electrodo de estimulación en el núcleo motor ocular común derecho, según coordenadas: 3,75 mm anterior, 1,5 mm lateral y 24 mm de profundidad a partir de la superficie cerebral (Berman, 1968) (figura 14). La localización exacta del punto de estimulación se realizó mediante la inducción por estímulos eléctricos de las respuestas motoras deseadas (abducción del ojo izquierdo y adducción del ojo derecho) con el mínimo posible de intensidad (mA). Una vez alcanzada el área de estimulación deseada, los electrodos se fijaron con cemento dental (Dura-lay) a la superficie craneal.

Los movimientos oculares se registraron mediante electrooculograma o por seguimiento electromagnético. Para el registro mediante electrooculograma se implantaron cuatro electrodos, dos en el apéndice frontal del arco cigomático de cada lado y otros dos en los bordes supra e infraorbitarios de la cavidad ocular. Para el registro mediante el sistema electromagnético de seguimiento del

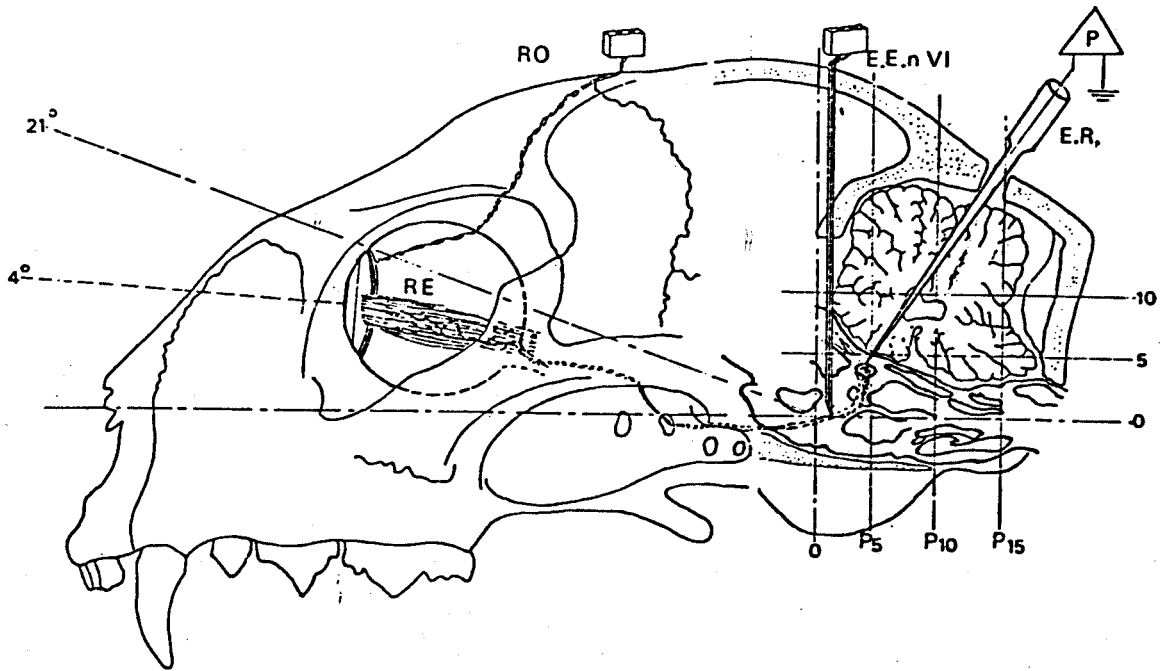


Figura 14.- Corte sagital de la cabeza del gato, donde se representa la vía de aproximación de los electrodos de estimulación y de registro. E.E.n VI, electrodo de estimulación del nervio del VI par craneal; E.R. electrodo de registro; P, preamplificador; RE, recto externo; RO, registrador ocular.

movimiento ocular se fijó, mediante puntos de sutura, alrededor de la esclerótica un hilo espiral de acero inoxidable aislado con teflón (Delgado-García y col., 1985 c) (figura 14).

La implantación de los electrodos de plata se realizó por vía transcutánea en los puntos indicados anteriormente. Para ello se lavó todo el campo operatorio con suero fisiológico estéril y mediante una fresa de tamaño apropiado se realizaron los orificios correspondientes atravesando la órbita ósea. Tras esta operación se anclaron los electrodos en sus correspondientes orificios y se fijaron con cemento dental, al objeto de obtener una buena estabilidad en el registro electrooculográfico. Los terminales de estos electrodos se llevaron hasta la calota craneana, vía transdérmica. Seguidamente se suturaron las incisiones utilizando cagut estéril del número cero para la aponeurosis y músculos, y seda trenzada del número uno para la piel. Las suturas se lavaron con suero fisiológico estéril y desinfectadas con spray antiséptico (Dermozel, Cooper-Zeltia).

Todos los terminales de los electrodos implantados se soldaron a un conector eléctrico, diseñado para tal fin, el cual, a su vez, se fijó al cráneo con cemento dental (figura 14)

El sistema para la fijación de la cabeza del animal consistió en tres tornillos de acero de 5 mm de diámetro y 20 mm de longitud, fijados en el cráneo con cemento dental; dos en el mismo plano frontal de cada lado y uno posterior y medial sobre la cresta occipital (figura 15). Alrededor de éstos se atornillaron otros más pequeños de 2 mm de diámetro y 7 mm de longitud, con objeto de dar consistencia y solidez a la unión de la resina sintética con el cráneo. Seguidamente, se practicó un orificio hasta la duramadre, por donde se introdujo un hilo de plata, utilizado como electrodo de referencia en el registro. Con todo esto se consiguió una plataforma fijada sólidamente al cráneo del gato. Al finalizar este montaje, se desinsertaron los músculos del cuello y se dejó al descubierto todo el hueso occipital. En la base de este hueso se atornillaron de un lado otros tres tornillos pequeños y sobre éstos se construyó una barrera de resina de unos 15 mm de altura y 2 mm de espesor uniendo ambas mastoides. Con esta barrera que actuaba a modo de pared, se evitó una reinserción en la cresta occipital de los músculos del cuello.

En el hueso occipital se practicó una craneotomía de unos 4 mm de diámetro hasta llegar a la duramadre. El orificio se limpió de restos óseos con suero fisiológico y el reborde óseo se selló con cera de hueso para evitar hemorragias procedente de los senos diploideos. Tras esta operación, se aplicó sobre el orificio una pomada de

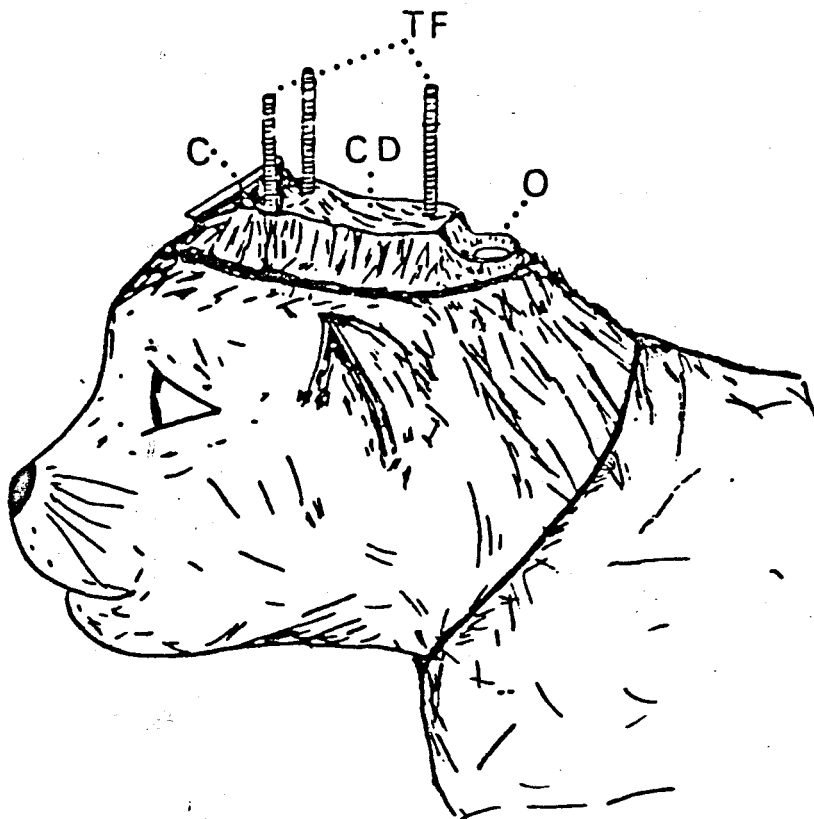


Figura 15.- Ilustración del resultado final del proceso quirúrgico. C, conector eléctrico; CD, cemento dental; O, orificio occipital para el abordaje transcerebelar del núcleo motor ocular externo; TF, tornillos de fijación. (Tomada de Serra, 1982).

gentamicina y se tapó con un material inerte (Silastic). Con esta preparación se facilitó el abordaje al núcleo en estudio. Para evitar problemas se respetó la duramadre hasta el momento del registro.

Todos los pasos descritos se realizaron en un mismo acto quirúrgico, cuya duración aproximada fue de 7 a 8 horas. La fase final del mismo consistió en cerrar los puntos hemorrágicos mediante espuma sintética (Surgicel, Johnson y Johson) y los bordes cutáneos y musculares se limpiaron con suero fisiológico estéril, y se desinfectaron con spray antiséptico. Se suturaron los bordes de la incisión craneal con objeto de cerrar la herida dejando visible la plataforma. Finalmente se aplicó Blastoestimulina, pomada de acción germicida.

En todas las intervenciones se administró al animal por vía subcutánea 50 ml de suero glucosado y complejo vitamínico B. En los animales donde se observaron signos de depresión cardiorespiratoria se administraron, además, analépticos respiratorios por vía intramuscular.

El postoperatorio se siguió bajo las mismas precauciones tomadas en las experiencias histológicas. Una vez el animal mostró signos de recuperación, se comenzaron las secciones de registro (duración de 2 a 5 horas por sesión), para lo cual se introdujo al animal dentro de un

confortable saco, se colocó suspendido en un sistema diseñado para tal fin, inmovilizándose su cabeza mediante un sustentador o barra de fijación (figura 16).

3.2.4 ESTIMULACION

Para la estimulación eléctrica se utilizaron electrodos fabricados con hilo de plata aislado con teflón, de 300 μm de diámetro y una punta libre de aislamiento de 100 a 500 μm . La estimulación fue bipolar, teniendo el electrodo paralelo una distancia entre las puntas de 0,5 a 1 mm. Se utilizaron pulsos simples rectangulares, negativos o positivos, con una duración para cada pulso de 10 a 50 μseg y un voltaje comprendido entre 1 y 20 V (la corriente máxima nunca excedió de 0,5 mA). La frecuencia de estimulación fue de 1 Hz. Como estimulador se utilizó un Cibertec CS-220 de dos canales, programable y con una unidad de aislamiento para cada canal.

Para estudiar la conducta de las motoneuronas del núcleo motor ocular externo durante el reflejo vestibulo ocular se utilizó como estimulación la rotación pasiva de la cabeza del animal, para lo cual se le colocó en una mesa giratoria diseñada para este fin (figura 16). El estímulo consistió en un giro sinusoidal de la mesa con una amplitud pico a pico de 30° y con un rango de frecuencia entre 0,1 y 6 Hz.

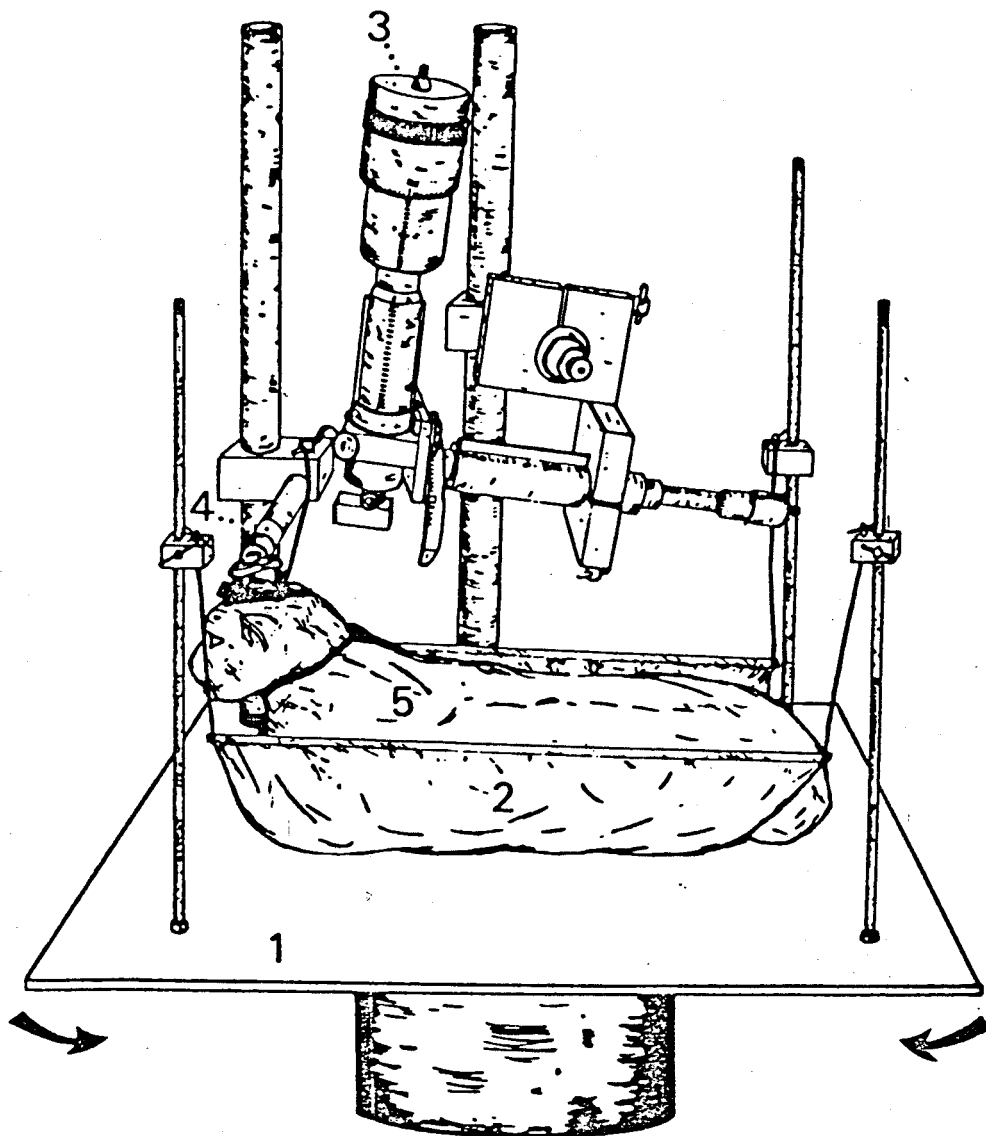


Figura 16.- Ilustración del sistema de suspensión del animal y fijación de la cabeza. 1, mesa giratoria; 2, sistema para mantener flotante el animal; 3, micromanipulador; 4, barra para la fijación de la cabeza del animal; 5, saco para mantener inmobilizado al animal. (Tomada de Serra, 1982).

Para estudiar la conducta de las motoneuronas del núcleo motor ocular externo ante las entradas visuales se presentaron al animal blancos fijos y en movimiento a distintas velocidades.

3.2.5 REGISTRO DE LOS MOVIMIENTOS OCULARES

Entre las técnicas de registro de los movimientos oculares (Carpenter, 1977; Leigh y Zee, 1983) se eligieron, por un lado, el método de registro en corriente continua o electrooculograma (EOG) y, por otro, el sistema electromagnético de seguimiento ocular. Las ventajas y desventajas de uno y otro sistema han sido ampliamente discutidas (Robinson, 1963; Fuchs y Robinson, 1966; Leigh y Zee, 1983). Debido a la pequeña magnitud de los potenciales generados por los movimientos oculares, en un rango de 20 a 40 μV , la señal se amplificó en un Tektronix AM 502 y se grabó, para su posterior análisis, en una cinta magnética Hewlett Packard.

Para analizar los movimientos oculares registrados fue necesario previamente calibrar el registro. La posición central del ojo en la órbita, es decir el valor de 0° , se calculó adquiriendo, en un osciloscopio digital Norland 3001A, todos los movimientos oculares durante 5 minutos, el punto central se consideró como 0° (López-Barneo y col.,

1982). La calibración de la amplitud de dichos movimientos se realizó por cambios de la posición del objeto en arcos de 10° y 20° derecha izquierda, arriba abajo, anotándose la amplitud y dirección de la señal registrada.

3.2.6 REGISTRO EXTRACELULAR

Como electrodo de registro se utilizaron pipetas de vidrio (Corning Corp.). Inicialmente, se lavaron en distintas soluciones (ácido nítrico, 20 minutos; agua bidestilada, 10 minutos; alcohol de 96° , 5 minutos; acetona, 5 minutos) y seguidamente secadas en estufa. Con este proceso se consiguió eliminar las impurezas añadidas al vidrio que alteran sus propiedades eléctricas y dificultan el llenado con la solución conductora. Para la fabricación de los microelectrodos se utilizó un estirador de pipetas Narishige, con el que se obtuvieron micropipetas con un diámetro comprendido entre 1 y $20\ \mu\text{m}$, bajo comprobación en microscopio óptico. Posteriormente se procedió a su llenado con una solución de ClNa 1,5M y saturadas con un colorante (azul cielo pontamina o verde rápido). Se seleccionaron aquellas micropipetas que presentaron mayor consistencia en la punta, y cuyas impedancias oscilaron entre 2-5 MOhm.

La señales obtenidas a través de las micropipetas se llevaron hasta un preamplificador NEX-11 (Biomedical Engineering Corp.), cuyas características permiten la

eliminación de ruidos eléctricos (Serra, 1982). Del preamplificador la señal se llevó a un amplificador diferencial Tektronix AM 502, de 200 M Ω de impedancia de entrada, donde se amplificó diez veces. Desde éste la señal se pasó, por un lado, hasta un audiomonitor de 3 W de potencia conectado con un altavoz y, por otro, se visionó en un osciloscopio Tektronix 5223. Cuando el registro mostró buena calidad e interés, se grabó en una cinta magnética Hewlett Packard 3968A.

El abordaje del núcleo motor ocular externo se realizó por vía transcerebelar (figura 14). En la primera sesión experimental se realizó, previa administración de anestésico local (Scandican), la apertura de la duramadre a través del orificio abierto en el hueso occipital durante el proceso operatorio. El microelectrodo se aproximó mediante un micromanipulador (Narishige Corp.) hasta reconocer el potencial antidrómico de campo del núcleo (Delgado-García y col., 1985 c). Posteriormente se aisló cada unidad mediante su activación antidrómica exclusiva desde el VI par homolateral. Terminada la sesión de registro se aplicó una lámina de silastic y un tapón de cera sobre el orificio.

3.2.7 VERIFICACION HISTOLOGICA

Una vez finalizada las sesiones experimentales se procedió a la verificación histológica de la zona de

registro. Para ello, en la última sesión experimental se llenó el microelectrodo con una solución colorante. Una vez situado en la zona de registro se pasó por el microelectrodo una corriente continua de 15 μ A durante 5 minutos suficiente para saturar de colorante el espacio circunscrito a la punta del microelectrodo.

Concluidas las sesiones de registro, los animales se sacrificaron con una sobredosis de anestésico y se perfundieron con una solución salina fría, seguida por una solución de formaldehído al 10%. Una vez fijados los cerebros, se cortó la región de la protuberancia en un microtomo de congelación (Leitz) en secciones de 50 μ m, y éstas se tiñeron según la técnica del Cresil-Violeta (Kluver y Barrera, 1953).

3.2.8 ADQUISICION Y ANALISIS DE DATOS

Los registros de la actividad de las motoneuronas controles y axotomizadas y de los movimientos oculares, que previamente se almacenaron en cinta magnética, se dispusieron para adquirirlos y analizarlos en un osciloscopio digital programable Norland 3001A (figura 17).

La señal de la posición ocular se pudo definir bien, sin consumir gran cantidad de memoria, con unidades de muestreo de 1 mseg, por lo cual pudo ser adquirida

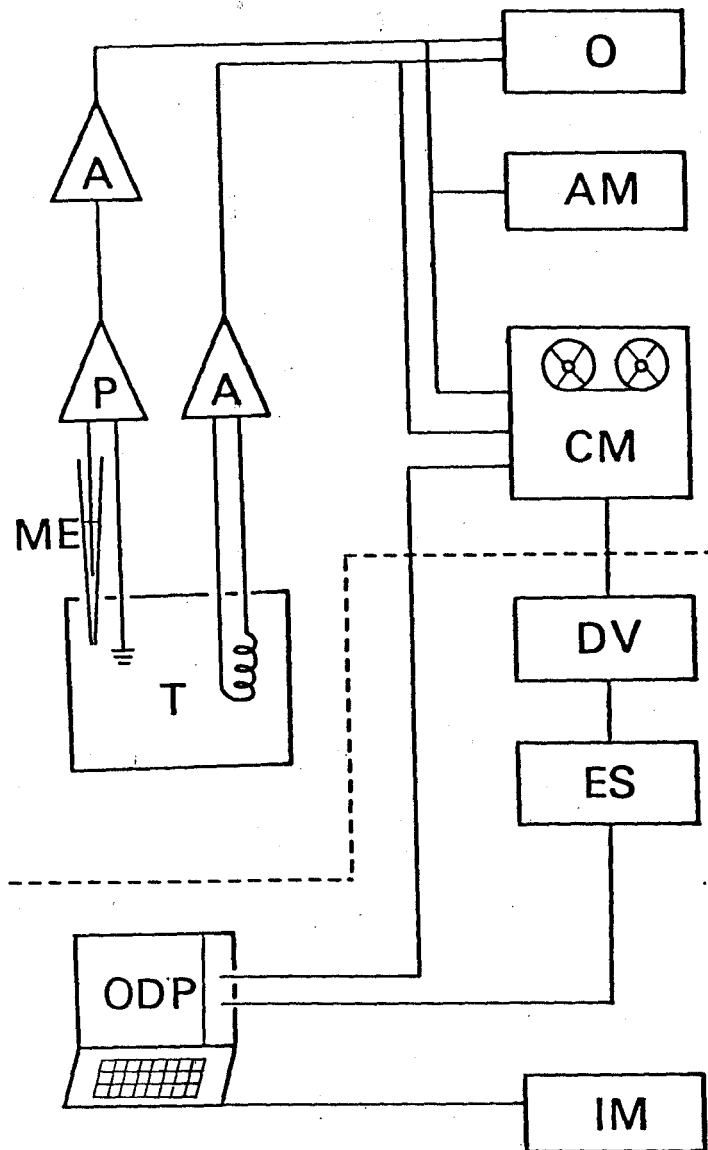


Figura 17.- Diagrama de bloques del sistema de registro, visualización, almacenaje y análisis de la señal proveniente del núcleo motor ocular externo y del movimiento ocular. A, amplificador; AM, audiomonitor; CM, cinta magnética; DV, discriminador de ventana; ES, estimulador; IM, impresora; ME, microelectrodo de registro; O, osciloscopio; ODP, osciloscopio digital programable; P, preamplificador; T, tejido.

directamente en el Norland 3001A. En cambio, la actividad en las motoneuronas necesita un periodo de muestreo mucho más corto, consumiendo tal cantidad de memoria en su adquisición que fue imposible introducir la señal directamente. Por esta razón se ideó un sistema de adquisición mediante el cual se convirtió la actividad en la motoneurona en un proceso puntual, que no desvirtuó las características temporales con la que ocurrió dicha actividad. De acuerdo con este proceso la actividad en las motoneuronas se pasó a través de un discriminador de ventana (Cibertec, PDV 105), dispositivo que genera un pulso de corta duración cuando la señal supera el umbral marcado externamente (el ajuste del umbral se determinó por la monitorización en un osciloscopio de éste y la señal). Este pequeño pulso se introdujo, como fuente, en un estimulador (Cibertec 220A) que genera pulsos de corta duración y frecuencias regulables externamente de acuerdo con las necesidades de adquisición en el Norland 3001A.

Una vez introducida la información en el osciloscopio digital programable se procedió al análisis de ésta. El análisis se realizó bien mediante funciones directas definidas en las propiedades del aparato, bien mediante programas elaborados para relacionar determinadas variables.

En base al sistema antes citado, para los

movimientos oculares se pudo definir: amplitud y duración del movimiento ocular, velocidad y aceleración que se desarrollan durante dicho movimiento. Para la actividad en las motoneuronas se establecieron parámetros como: frecuencia instantánea interespiga, representada por el inverso del tiempo transcurrido entre dos potenciales de acción, histogramas de frecuencias y frecuencia máxima de actividad durante un movimiento. La importancia de cada uno de estos parámetros en la caracterización de la actividad de las motoneuronas durante movimientos oculares está, en parte, reflejada en los resultados y discusión de este trabajo.

4 RESULTADOS

4.1 VARIANTES APLICADAS A LA TECNICA DE LA PEROXIDASA DE RABANO

Para la obtención de la máxima sensibilidad en la actividad de la peroxidasa de rábano se estudiaron sistemáticamente los efectos de diferentes componentes en el medio, tal y como se detallan a continuación.

4.1.1 VARIANTES APLICADAS EN EL PROTOCOLO DE REVELADO CON TETRAMETILBENZIDINA

Cuando se utilizaron cantidades crecientes de nitroferricianuro sódico (10, 30, 100, 300 mg) se observó, por una parte, que el número de neuronas marcadas aumentó sensiblemente con la concentración y, por otra, no se apreció una fuerte disminución del producto de reacción inespecífico para las concentraciones más bajas. La cantidad de 300 mg fue la más idónea para el revelado de la tetrametilbenzidina.

La segunda variación en el protocolo de revelado

con la tetrametilbenzidina consistió en el filtrado del medio de incubación, antes de la introducción del tejido en éste. En otro grupo de secciones de tejido se utilizó una solución estabilizadora como último paso de la reacción enzimática. Ninguno de estos dos factores mejoraron los resultados finales obtenidos, siendo indiferente la presencia o ausencia de ambos pasos.

La concentración de peróxido de hidrógeno fue un factor determinante en las características de la reacción con la peroxidasa de rábano. La concentración ideal, que se precisó para el revelado de la actividad enzimática, fue de difícil evaluación, ya que cambios en la temperatura ambiente interfirieron en la velocidad de la reacción. Esta modificación de la velocidad de reacción condujo, en ocasiones, a la infravaloración del número de neuronas marcadas o a la producción de precipitados inespecíficos en las preparaciones. Debido a estas circunstancias, la aplicación de la variante de glucosa oxidasa fue, según los resultados obtenidos, menos alterable y produjo mejores marcajes neuronales. En la tabla I se resumen los resultados obtenidos según la variante aplicada.

En la figura 18 A se muestra la población de motoneuronas del núcleo motor ocular externo marcadas con el producto de reacción de la peroxidasa de rábano, utilizando como cromógeno la tetrametilbenzidina y la actividad de la

glucosa oxidasa como suministradora del poder de oxidación.

4.1.2 VARIANTES APLICADAS EN EL PROTOCOLO DE REVELADO CON DIAMINOBENZIDINA

Al igual que en el caso anterior, el filtrado no modificó los resultados obtenidos al utilizar diaminobenzidina como sustancia cromógena. Por otra parte, no se encontraron modificaciones en la eficacia de la reacción al procesar ésta según las variantes del peróxido de hidrógeno o de la glucosa oxidasa. En la figura 18 C se muestra un grupo de motoneuronas del núcleo motor ocular externo marcadas con el producto de reacción de la peroxidasa de rábano, utilizando como cromógeno la diaminobenzidina y la actividad glucosa oxidasa como suministradora del poder de oxidación. En dicha microfotografía se pueden observar los gránulos, dispersos por el citoplasma y dendritas principales, formados por el producto de reacción de la peroxidasa de rábano.

El empleo de cloruro de cobalto reforzó el producto de reacción de la peroxidasa de rábano en las neuronas marcadas, coincidiendo con lo descrito por otros autores (Adams, 1977; Itoh y col., 1979). La concentración

óptima a la que se empleó este producto fue del 0,5%, en tampón TRIS. La utilización del cloruro de cobalto produjo una tinción indiscriminada de todas las neuronas en la sección de tejido elegida. En la figura 18 B se muestra un ejemplo de motoneuronas del núcleo motor ocular externo marcadas, usando como cromógeno la diaminobenzidina y en presencia de cloruro de cobalto al 0,5% en tampón TRIS.

El revelado de la reacción de la peroxidasa de rábano con tetrametilbenzidina o diaminobenzidina fue similar cuando las secciones de tejido se realizaron por congelación o mediante vibratomo. Por otra parte, para el estudio de las secciones de tejido bajo el microscopio óptico, fue tan válida la recogida de dichas secciones en tampón fosfato 0,1M (pH 7,4) como en solución de recogida (ver apartado 3.1.3 procesamiento de los cerebros: fijación y técnicas histoquímicas).

En la tabla II se resumen los resultados obtenidos con las variantes aplicadas a la reacción de la peroxidasa de rábano utilizando diaminobenzidina como sustancia cromógena.

4.2 EFECTOS DE LA AXOTOMIA SOBRE LA MORFOLOGIA DE LAS MOTONEURONAS DEL NUCLEO MOTOR OCULAR EXTERNO

Las características morfológicas del núcleo motor ocular externo se estudiaron mediante la inyección de la enzima peroxidasa de rábano en el músculo recto externo (figuras 19 y 20). En la microfotografía 20 A, tomada de una sección coronal a nivel de la protuberancia, aparece dicho núcleo formado por dos masas neuronales aisladas; la más numerosa se situó bajo la rodilla del facial, formando el núcleo del motor ocular externo principal. Próximo a él, en posición más ventral y lateral, se localizó el núcleo del motor ocular externo accesorio, cuyas neuronas envían sus axones a través del VI par craneal para inervar el músculo retractor bulbi.

Dentro del núcleo del motor ocular externo (denominación usada, habitualmente, para referirse a la porción principal de dicho núcleo) se reconocieron dos grupos neuronales que se diferenciaron por sus áreas de proyección (figura 19 A y B). Las motoneuronas, cuyos axones viajan por el VI par craneal hasta el músculo ocular recto externo, y las interneuronas, que proyectan al núcleo del motor ocular común contralateral. Ambos tipos neuronales se encontraron entremezclados a lo largo del núcleo (figura

19 C), si bien se detectó mayor proporción de motoneuronas (2:1). Las motoneuronas se distribuyeron homogéneamente a través del núcleo, mientras que las interneuronas se encontraron, en ocasiones, formando agrupaciones de 5 a 10 neuronas.

En la figura 20 se muestra una sección coronal del núcleo motor ocular externo. En este caso, la peroxidasa de rábano se inyectó en el músculo recto externo dos meses después de su denervación por axotomía periférica del VI par craneal. En la figura 20 se observa la drástica disminución de la población de motoneuronas tras su axotomía (Ax), si se compara con la control (C).

En cortes seriados, y mediante la cámara clara acoplada al microscopio, se estudió la distribución espacial (en los planos coronal y sagital) de las poblaciones de motoneuronas marcadas para los grupos control y axotomizado (figuras 21 y 22). En las controles, la densidad de motoneuronas fue mayor en las regiones centrales del núcleo, disminuyendo progresivamente hacia las áreas más periféricas de éste. No se observó ninguna distribución especial en función del tamaño o de la forma. El número medio de motoneuronas marcadas en el núcleo control fue de 1.248 ± 64 D.T. (desviación típica) (rango 1143-1315). La población de motoneuronas axotomizadas se distribuyó espacialmente de forma similar a las controles, aunque menos

densamente agrupadas. El número medio de motoneuronas marcadas, después de la reinervación del músculo recto externo, fue de 642 ± 34 D.T. (rango 605-680), es decir, alrededor del 50% menos que las encontradas en los controles. La incapacidad de las motoneuronas axotomizadas para reinervar siguió un patrón aleatorio, no encontrándose en ninguna región del núcleo mayor pérdida de motoneuronas marcadas (figura 21 C-Ax).

La capacidad para la reinervación de las motoneuronas axotomizadas tampoco fue superior para ninguno de los tipos morfológicos presentes en el núcleo (figuras 20 y 23). Todos los tipos morfológicos encontrados en los grupos controles (multipolar, piramidal y fusiforme) se observaron, también, en el núcleo dos meses después de la axotomía. Normalmente las motoneuronas axotomizadas mostraron un producto de reacción menos intenso, a la vez que su acumulación en la dendritas principales fue tan leve que seguir la trayectoria de éstas fue muy difícil. Estos hechos revelan que las motoneuronas axotomizadas tuvieron importantes deficiencias en el transporte axonal retrógrado de la peroxidasa de rábano. Por último, no se observaron cambios significativos en la distribución espacial de las dendritas principales de las motoneuronas tras la axotomía.

También se estudiaron los cambios inducidos por la axotomía en las características morfométricas de las

poblaciones de motoneuronas marcadas tanto control como axotomizada (figura 24). El tamaño del soma de las motoneuronas se consideró como el valor medio de sus diámetros mayor y menor (sólo se midieron aquellas células cuyos núcleos aparecieron completamente rodeados por el producto de reacción de la peroxidasa de rábano). Estas medidas no se ajustaron para compensar el encogimiento del tejido durante el proceso histoquímico. La distribución de tamaños del soma neuronal en ambos grupos, control y axotomizado, fue normal ($p \leq 0,05$, test de Chi cuadrado). El diámetro medio para las motoneuronas controles fue de $23,1 \mu\text{m} \pm 1,86$ D.T. (rango 14-32 μm), mientras que para las axotomizadas fue de $24 \mu\text{m} \pm 1,89$ D.T. (rango 16-36 μm). Los grupos control y axotomizado no pudieron ser diferenciados de acuerdo al tamaño de sus somas ($p \leq 0,01$, test de ANOVA modelo 1).

4.3 EFECTOS DE LA AXOTOMIA SOBRE LA MECANICA OCULAR

En los animales controles los movimientos y/o fijaciones de ambos ojos se encontraron perfectamente acoplados (figura 26 C), de tal manera que éstos, generalmente, mantuvieron la misma posición en sus órbitas respectivas. Este hecho indicó la presencia de visión binocular para dichos animales. La axotomía del VI par craneal en el ojo izquierdo provocó en éste la imposibilidad de alcanzar y/o mantener posiciones a la izquierda de 0° (valor en grados atribuido cuando el ojo se sitúa en el centro de la órbita) (figura 25). Este efecto fue desapareciendo paulatinamente, probablemente de forma paralela con la reinervación del músculo recto externo; no obstante, la recuperación en la motilidad ocular no fue nunca completa durante el periodo de experimentación, de tal manera que un año después de la axotomía el ojo lesionado fue incapaz de alcanzar posiciones entre 10° y 15° grados a la izquierda. La presencia de estas anomalías en la mecánica ocular puso de manifiesto la eficacia del proceso de lesión, así como evidenció la respuesta regenerativa del VI par craneal. Otro efecto de la axotomía fue la imposibilidad del ojo afectado (izquierdo) para mantener fijaciones, en cualquier dirección, en el plano horizontal (figura 25). Los valores que tomó el ojo lesionado en los

movimientos y/o fijaciones hacia la derecha fueron similares a los controles (figura 26 Ax), aunque en la figura 25 se representan como ligeramente inferiores con el fin de seguir la evolución de la posición en ambos ojos sin mezclar los registros.

Los resultados mostrados en las figuras 26 y 27 se realizaron mediante adquisiciones de 5 minutos en un osciloscopio digital programable. Durante estas adquisiciones se muestrearon cada 20 mseg las posiciones de ambos ojos en el plano horizontal (figura 26) o de cada ojo en el espacio (figura 27) antes y después de la axotomía. La figura 26 C muestra, en los animales controles, una clara relación lineal con pendiente 1 entre las posiciones que ocuparon los ojos derecho (ordenadas) e izquierdo (abcisas). Este tipo de relación indicó que ambos ojos conjugaron sus posiciones en la órbita con el fin de mantener la visión binocular. Tras la axotomía del VI par craneal (figura 26 Ax), la relación lineal con pendiente 1 se mantuvo hasta que el ojo izquierdo se aproximó a posiciones cercanas a 0° , entonces cambió la trayectoria en la representación mostrándose un proceso de saturación en la curva. Este tipo de representación ratificó la eficacia en el proceso de lesión, de tal modo que el ojo derecho pudo alcanzar cualquier posición en la órbita, en el plano horizontal, mientras que el ojo izquierdo lesionado tuvo un rango de movimientos y/o fijaciones oculares restringido a aquellos

que pudieron ser realizados por el músculo recto interno. La silueta de esta curva se modificó progresivamente con el proceso de reinervación, de tal forma que la saturación en la curva se situó paulatinamente en posiciones más excéntricas hacia la izquierda.

En la figura 27 se muestra el efecto de la axotomía del VI par craneal sobre el rango de movimientos del ojo afectado en el plano vertical. En los grupos controles (figura 27 C), la nube de puntos que se obtuvo indicó que el ojo pudo situarse en cualquier posición de la órbita, salvo (para el ojo derecho) aquellas localizadas más a la izquierda y abajo, por las dificultades que impone el tabique nasal para la visión. Cuando se practicó la axotomía en el ojo izquierdo no se observó (figura 27 Ax) ninguna limitación sobre el rango de movimientos en el plano vertical. Naturalmente, en el plano horizontal la falta de funcionalidad en el músculo recto externo impuso limitaciones de características parecidas a las mencionadas anteriormente, según las cuales no se detectó ningún punto a la izquierda del valor 0° (centro de la órbita).

Tras la axotomía del VI par del lado izquierdo se observó frecuentemente (figura 28) que el ojo derecho inició un lento deslizamiento hacia posiciones más centrales en la órbita inmediatamente después de movimientos sacádicos hacia la izquierda. Este fenómeno no ocurrió cuando el movimiento

finalizó antes de 0° , lo que parece indicar, dentro del sistema motor ocular, la presencia de un mecanismo compensatorio tendente a corregir las situaciones de visión doble.

4.4 IDENTIFICACION ANTIDROMICA DE LAS MOTONEURONAS AXOTOMIZADAS DEL NUCLEO MOTOR OCULAR EXTERNO

Las motoneuronas controles y axotomizadas del núcleo motor ocular externo se reconocieron como tales por su activación antidrómica desde el nervio del VI par craneal homolateral (figura 29). En ambos tipos de motoneuronas los potenciales de acción generados por la invasión antidrómica del soma neuronal se registraron como una onda trifásica (positiva-negativa-positiva). La duración media de la onda, es decir, el tiempo transcurrido entre los dos picos positivos, fue de $0,7 \text{ mseg} \pm 0,03 \text{ D.T.}$ ($n= 20$) en las motoneuronas controles, mientras que en las axotomizadas fue ligeramente inferior $0,61 \text{ mseg} \pm 0,04 \text{ D.T.}$ ($n= 46$). Esta diferencia se debió, probablemente, a las dificultades encontradas para determinar con exactitud el segundo pico positivo y, en cualquier caso, no fue significativa ($p \leq 0,05$, de acuerdo con el test de la t de Student).

El cambio más destacado que se observó en las espigas somáticas generadas antidrómicamente fue el retraso en la invasión del segmento inicial y del espacio somato-dendrítico. La invasión de ambos compartimientos produjo, sólo en las motoneuronas axotomizadas, inflexiones separadas en las espigas somáticas (figura 29). Este

fenómeno parece indicar un cambio en la eficacia para el flujo de corriente en ambos compartimientos. Otro hecho destacado fue la dificultad, en ocasiones, de invadir antidrómicamente las motoneuronas axotomizadas, incluso con estímulos supraumbrales (en este caso, se consideró como umbral la corriente necesaria para invadir antidrómicamente cualquier motoneurona control). Este fenómeno ha sido descrito con gran detalle por otros autores (Baker y col., 1981; Ribas y col., 1982; ver apartados 5.3 y 5.4).

Tras la axotomía se observó un incremento en la latencia de activación antidrómica (considerando como tal el retraso entre la producción del estímulo y la aparición de los picos positivo-negativo-positivo en la espiga somática) de las motoneuronas axotomizadas (figura 29; tabla III). Este efecto se hizo más acentuado en las motoneuronas lesionadas mediante su axotomía central. En la tabla III se muestran las modificaciones en la latencia de invasión antidrómica, en los tres grupos experimentales (control, axotomía periférica y axotomía central). Estos resultados evidenciaron cambios significativos entre las motoneuronas controles y axotomizadas centralmente ($p \leq 0,05$, de acuerdo con el test de la t de Student). En base a las latencias mostradas en la tabla I y la distancia desde el punto de estimulación eléctrica en el VI par craneal homolateral, la velocidad de conducción para las motoneuronas controles y axotomizadas periférica o centralmente fue, respectivamente, de 28,5

m/seg \pm 1,2 D.T. (rango, 13-70), 21,2 m/seg \pm 1,4 D.T.
(rango, 11,1-50) y 16,4 m/seg \pm 1,3 D.T. (rango, 7,1-33).

4.5 ACTIVIDAD DE LAS MOTONEURONAS AXOTOMIZADAS DEL NÚCLEO MOTOR OCULAR EXTERNO

Las motoneuronas del núcleo motor ocular externo utilizadas como controles presentaron una actividad tónica relacionada con la posición del ojo en la órbita, de modo que sus frecuencias de disparo aumentaron con las posiciones más excéntricas del globo ocular en la dirección de activación y disminuyeron con las fijaciones oculares en la dirección de inactivación (figura 30). Esta actividad no estuvo presente en todo el rango de posiciones oculares (figura 30 A), sino que sólo se inició a partir de una determinada posición del ojo en la órbita, denominada umbral (así pues, se definió el valor umbral como aquella posición del ojo en la órbita para la cual la motoneurona presentó la mínima actividad tónica). Las motoneuronas controles también mostraron una actividad fásica o en brote relacionada con la presencia de movimientos oculares sacádicos, siempre que éstos ocurriesen en la dirección de activación (figura 30). La actividad fásica en las motoneuronas controles comenzó $6 \text{ mseg} \pm 2,5 \text{ D.T.}$ antes del inicio del movimiento. Por otro lado, en la figura 30 se muestra cómo la estimulación, que generó el electrodo implantado en el nervio del VI par craneal, permitió en todo momento el reconocimiento antidrómico de la neurona

registrada e indujo ortodrómicamente pequeñas contracciones musculares en el músculo recto externo homolateral.

La anomalía más destacada que presentaron las motoneuronas axotomizadas del núcleo motor ocular externo fue su incapacidad para mantener su actividad tónica durante fijaciones oculares, excepto cuando el ojo ocupó posiciones muy excéntricas en la dirección de activación. Esta fatigabilidad de la actividad tónica se manifestó especialmente cuando las fijaciones oculares duraron más de 0,5 seg (figura 31) y cuando las motoneuronas axotomizadas se registraron entre 30 y 60 días después de la lesión. En cambio, las motoneuronas axotomizadas mantuvieron, aunque de forma distinta, su actividad fásica durante los movimientos sacádicos en la dirección de activación. Esta actividad comenzó $38 \text{ mseg} \pm 14 \text{ D.T.}$ después de iniciado el movimiento (figura 31). Por otro lado, la figura 31 muestra, además de los fenómenos arriba mencionados, la insensibilidad del ojo izquierdo al movimiento ya se indujesen éstos por la actividad de la motoneurona o por la estimulación desde el electrodo bipolar.

Otro rasgo característico en la actividad de las motoneuronas axotomizadas fue la aparición de brotes de corta duración antes o durante movimientos sacádicos en la dirección de inactivación (figura 32). Por otro lado, en la misma figura se muestra la necesidad para las motoneuronas

axotomizadas de facilitación sináptica para la invasión antidrómica en dichas motoneuronas.

La actividad de las motoneuronas un año después de axotomizadas mostró un grado alto de recuperación (figura 33). Sin embargo, alguna de las anomalías detectadas desde poco tiempo después de la lesión se continuaron observando en estas motoneuronas, pero exclusivamente cuando la posición ocular se situó próxima al umbral de actividad para dichas motoneuronas. En la figura 33 se muestra, mediante histograma de frecuencias, la actividad en las motoneuronas axotomizadas un año después de la lesión. En este caso, todavía se observan fenómenos como el retraso en el inicio del brote de actividad (figura 33 A) o una rápida fatigabilidad de la actividad tónica para posiciones mantenidas (figura 33 A y B). En cualquier caso, la recuperación funcional en estas motoneuronas se deduce de que estuvieran activas sin anomalías durante gran parte del rango de movimientos oculares desde su umbral, así como que la disminución de la frecuencia de disparo fue más lenta (figura 33 B), durante fijaciones oculares.

4.6 ANALISIS DE LA ACTIVIDAD DE LAS MOTONEURONAS AXOTOMIZADAS DEL NUCLEO MOTOR OCULAR EXTERNO

4.6.1 ANALISIS DE LA ACTIVIDAD DURANTE FIJACIONES OCULARES

Para la realización de la figura 34 se eligieron dos motoneuronas una control (C) y otra axotomizada (Ax), con umbrales de activación similares para la posición ocular. En cada caso, se seleccionaron tres movimientos oculares (sacádicos) que se iniciaron de 0 a 3 grados a la derecha de dicho umbral y que llegaron hasta tres posiciones oculares similares para ambos supuestos experimentales. En esta figura se muestra, mediante histograma de frecuencias, en las motoneuronas controles la actividad tónico-fásica proporcional a posición y velocidad ocular que las caracterizó. Por su parte, las motoneuronas axotomizadas mostraron menor sensibilidad a la posición y velocidad ocular; es decir, las motoneuronas axotomizadas respondieron con una subida de frecuencia menor que en las controles para movimientos y/o fijaciones en la dirección de activación.

La sensibilidad a la posición ocular se midió tanto en la población de motoneuronas controles como en la

de axotomizadas. Así mismo, se determinaron los cambios producidos por la lesión sobre el umbral de actividad en dichas poblaciones (figura 35 y tabla IV). Para evaluar la sensibilidad de la población de motoneuronas axotomizadas a la posición (k , impulsos/seg/grado) se consideraron preferentemente aquellas fijaciones oculares extremas, en la dirección de activación, que se acompañaron por frecuencias tónicas mantenidas. Para establecer las relaciones lineales entre frecuencia (impulsos/seg) y posición del ojo (grados) se consideraron los valores medios en dicha frecuencia (150 msec) después de terminado el movimiento. De este modo se obtuvieron las familias de rectas mostradas en la figura 35 para las motoneuronas de ambos grupos experimentales, así como los resultados de la tabla IV. La sensibilidad de las motoneuronas axotomizadas a la posición ocular fue menor ($\approx 25\%$) que en las controles. Concretamente, las motoneuronas controles y axotomizadas tomaron valores para k de 8,7 impulsos/seg/grado \pm 2,5 D.T. y 6,5 impulsos/seg/grado \pm 3,1 D.T., respectivamente. Esta disminución de la sensibilidad a la posición ocular resultó más evidente para las motoneuronas axotomizadas centralmente o en aquellas registradas entre 30 y 90 días después de la lesión (tabla IV). La sensibilidad a la posición ocular, en la población de motoneuronas axotomizadas, se recuperó paulatinamente, de tal modo que un año después de la lesión no se apreciaron alteraciones para los valores de k obtenidos.

En base a la relación frecuencia/posición ocular se dedujo el umbral de actividad de cada motoneurona, en los dos supuestos experimentales, así como el valor de dicho umbral para las poblaciones respectivas (tabla IV). El umbral medio de actividad para la población de motoneuronas controles fue de $3,3^\circ$ (derecha) $\pm 5,2$ D.T. , mientras que entre 30 y 90 días después de la axotomía, éste se desplazó hacia la izquierda en las motoneuronas axotomizadas tomando como valor $1,2^\circ$ (derecha) $\pm 6,1$ D.T. Este resultado indicó que las motoneuronas axotomizadas requirieron de posiciones más excéntricas en la dirección de activación para iniciar su actividad.

Aunque generalmente el valor de la constante para la sensibilidad a la posición ocular k fue menor en las motoneuronas axotomizadas, en algunos casos éstas ($n=4$) presentan valores de k de hasta 20 impulsos/seg/grado. Así, para este grupo de motoneuronas la sensibilidad fue incluso mayor que la obtenida para las controles. Estos valores de k se pueden deber a las dificultades impuestas por el método de análisis. Normalmente, estas motoneuronas se encontraron fuertemente afectadas por la axotomía de tal forma que sólo se pudieron obtener datos de frecuencias tónicas mantenidas para posiciones oculares muy extremas; el resto se obtuvo como los valores medios de la frecuencia 150 mseg después del movimiento, lo cual, probablemente, introdujo cierto

error por la presencia remanente del componente fásico de la frecuencia.

4.6.2 ANALISIS DE LA ACTIVIDAD DURANTE MOVIMIENTOS OCULARES SACADICOS: ASPECTOS GENERALES

En la figura 36, las líneas marcadas como F representan las envolventes de los histogramas de frecuencias (figura 36 A) que presentaron una motoneurona control (figura 36 A y B) y otra axotomizada (figura 36 C) durante dos movimientos sacádicos de similares características. En ambas situaciones experimentales las motoneuronas mostraron un aumento progresivo de su frecuencia de disparo hasta llegar a un máximo. A partir de este punto, la frecuencia disminuyó hasta que alcanzó un nuevo valor relacionado con la nueva posición ocular en las motoneuronas controles, mientras que en las axotomizadas la frecuencia se perdió totalmente durante la fijación (ver apartado 4.6.1).

De la actividad total (F) de motoneuronas controles y axotomizadas se separó el incremento de actividad correspondiente al cambio de posición ocular durante el movimiento. Dicho componente de posición (kP), en la frecuencia, se calculó como el producto de la constante neuronal k por la posición instantánea del ojo en la órbita (ver apartado 1.8). Los procedimientos para calcular k en las dos situaciones experimentales han sido descritos en otro lugar (ver apartado 4.6.1). La sustracción del

componente de posición (kP) de la actividad total (F) de las motoneuronas durante los movimientos sacádicos permitió obtener el valor instantáneo $F-kP$, el cual se consideró similar al componente de velocidad ($r\dot{F}$) de la actividad de ambos tipos de motoneuronas. La figura 36 muestra los componentes de posición y velocidad, calculados instantáneamente mediante ordenador y según el procedimiento descrito, de la frecuencia total para las motoneuronas control y axotomizada. En la figura se aprecia la correlación entre $F-kP$ y la velocidad ocular (\dot{P}) durante el movimiento. Se destaca en esta figura la escasa importancia de la entrada del componente de posición, en las motoneuronas axotomizadas, durante el movimiento ocular.

En la figura 37 se muestra el componente de velocidad de la frecuencia obtenida para una motoneurona control (C) y otra axotomizada (Ax) durante tres movimientos de características similares. Aunque las cinéticas de este componente de velocidad para las motoneuronas axotomizadas fueron similares a las mostradas por las controles, se pudieron observar dos importantes diferencias: a) El máximo de frecuencia en las motoneuronas axotomizadas fue un 45% más pequeño que en las controles; y b) La duración del brote de actividad fue un 30% menor en las motoneuronas axotomizadas que en las controles.

Utilizando el método arriba indicado para aislar el

componente de velocidad de la frecuencia, se analizó la sensibilidad (tomada como el cambio en el valor de la frecuencia máxima de este componente) a la velocidad del movimiento ocular, tanto en motoneuronas controles como axotomizadas (figura 38). La constante r en cada motoneurona, control o axotomizada reflejó su ganancia en frecuencia para movimientos oculares de tipo sacádico. La sensibilidad al movimiento ocular fue menor en las motoneuronas axotomizadas ($r = 0,84$ impulsos/seg/grado/seg $\pm 0,55$ D.T.) que en las controles ($r = 1,18$ impulsos/seg/grado/seg $\pm 0,48$ D.T.). Este efecto se acentuó cuando los registros se realizaron en motoneuronas axotomizadas centralmente y cuando dichos registros se hicieron entre 30 y 90 días después de la lesión.

En la figura 39 se representan las correlaciones entre la frecuencia total (F) (línea de puntos rellenos) y el componente de velocidad de dicha frecuencia ($F-kP$) (línea de puntos vacíos) de una motoneurona control (C) y una axotomizada (Ax) con la velocidad ocular durante dos movimientos sacádicos de similares características. Se entiende que sólo se representa la evolución de las relaciones F frente a \dot{P} y $F-kP$ frente a \dot{P} , durante el movimiento, es decir, durante el tiempo que \dot{P} fue diferente de 0. El sentido de las flechas en las figuras indica el inicio y el final del movimiento. Para realizar estas representaciones el perfil de la frecuencia instantánea de

disparo se puso en fase con la velocidad ocular. Para las motoneuronas controles, el inicio de ambas representaciones (puntos rellenos y vacíos mezclados) fue similar, lo que indicó que la frecuencia total (F) se originó exclusivamente a partir del componente de velocidad. Posteriormente, la presencia (línea de puntos rellenos) o ausencia (línea de puntos vacíos) del componente de posición kP hizo que las trayectorias fuesen distintas. En el caso de la representación F frente a la velocidad ocular se observó un fenómeno claro de histéresis, obteniéndose mayor velocidad para una frecuencia en la fase inicial que en la fase final del movimiento. En el caso de la relación $F-kP$ frente a velocidad ocular, el fenómeno de histéresis fue menor ya que, obviamente, $F-kP$ debe ser, al menos en teoría, muy similar al valor de $r\dot{P}$ (ver apartado 1.8); además, en este caso se obtuvo mayor velocidad para una frecuencia dada en la fase final del movimiento. La correlación entre el componente de velocidad ($F-kP$) de la frecuencia y la velocidad ocular fue ($r = 0,91$) mayor que entre esta última y la frecuencia total (F) ($r = 0,75$) (figura 39). Por su parte, en las motoneuronas axotomizadas (figura 39 Ax) la entrada del componente de posición kP durante el movimiento fue poco significativa, ya que la trayectoria seguida por ambas representaciones fue similar. Concretamente, los coeficientes de correlación no cambiaron significativamente al representar el componente de velocidad de la frecuencia $F-kP$ frente a la velocidad ocular ($r = 0,87$) o ésta frente a

la frecuencia total (F) ($r = 0,83$) (figura 39 Ax). No obstante, el hecho de que al final del movimiento la frecuencia total (línea de puntos rellenos) no volviese a cero indicó que el componente de posición de la frecuencia total estuvo presente, aunque muy debilmente, durante el movimiento ocular.

Los resultados mostrados en la figura anterior pusieron en duda la presencia del componente de posición o tónico de la frecuencia (kP) en las motoneuronas axotomizadas, durante movimientos oculares. Sin embargo, la figura 40 muestra que la entrada de dicho componente dependió de las características del movimiento, así como de la posición ocular final que se alcanzó una vez que terminó éste. Los números 1, 2 y 3 hacen referencia en la figura 40 a tres situaciones experimentales diferentes para las motoneuronas axotomizadas. En la primera situación la actividad de la motoneurona axotomizada se mantuvo, una vez finalizado el movimiento, aunque con signos anómalos como la presencia de brotes de actividad en movimientos en la dirección de activación. Para estas condiciones el componente de velocidad (F-kP) fue muy similar a los mostrados en las motoneuronas controles, precediendo su frecuencia máxima al pico de la velocidad ocular (ver estrella en la figura 40). Las representaciones de frecuencia total frente a velocidad ocular o ésta frente al componente de velocidad de la frecuencia (gráficos E y F en

la figura 40), tuvieron trayectorias similares a las obtenidas en las motoneuronas controles (Fig. 39 C), lo cual indicó que el componente de posición estuvo presente. Por su parte, en las situaciones segunda y tercera se muestran dos ejemplos donde la frecuencia de la motoneurona axotomizada no se mantuvo durante la fijación siguiente. En estas situaciones, incluso el componente de velocidad de la frecuencia se afectó, ya que entró con retraso respecto a la velocidad del movimiento ocular. Cuando no se corrigió el desfase entre las curvas de frecuencia y de velocidad ocular aparecieron siluetas extrañas en las representaciones E y F (ejemplo 2 en la figura 40), en las cuales se observaron dos máximos bien definidos correspondiente a la velocidad ocular máxima y a la frecuencia máxima, respectivamente. Cuando la frecuencia y la velocidad se puso en fase en las representaciones E y F (ejemplo 3 en la figura 40) aparecieron anomalías similares a las descritas para la figura 39 Ax.

4.6.3 ANALISIS DE LA SUBIDA DE FRECUENCIA DURANTE MOVIMIENTOS SACADICOS: FASE INICIAL

Para el análisis de la evolución de las frecuencias de disparo presentes tanto en las motoneuronas controles como en las axotomizadas, se tomaron exclusivamente aquellos movimientos que se iniciaron desde posiciones oculares entre 0 y 3 grados a la derecha del umbral de activación de la motoneurona estudiada. De esta forma se evitó la presencia de actividad tónica inicial, pudiéndose determinar claramente los intervalos entre los potenciales de acción producidos durante los movimientos sacádicos. En la figura 41 C se muestra la evolución de las frecuencias de disparo, medida como el inverso del intervalo de tiempo entre dos potenciales de acción, que presentó una motoneurona control durante 6 movimientos. En la mayoría de los casos (80%) la frecuencia máxima se alcanzó durante el cuarto o quinto intervalo. Posteriormente, la frecuencia disminuyó hasta alcanzar un nivel de disparo correlacionado con la nueva posición ocular. De acuerdo con los resultados obtenidos la frecuencia máxima se relacionó con los parámetros del movimiento, es decir, velocidad ocular máxima, amplitud y duración (no ilustrado). Así mismo, la cinética de subida hasta dicha frecuencia varió, siendo más lenta en aquellos movimientos que requirieron menor

frecuencia máxima y viceversa. Concretamente, en los 6 ejemplos mostrados en la figura 41 C el tiempo invertido en alcanzar la frecuencia máxima varió en un rango de 100 mseg (entre 47 y 147 mseg). En conclusión, se pudo establecer una relación inversa entre la frecuencia máxima y el tiempo empleado en conseguirla. Por otro lado, se observó que el fenómeno anteriormente descrito venía implícito desde el primer intervalo, ya que los valores tomados por éste cambiaron paralelamente a los de frecuencia máxima (Figs. 42 C y 43 C).

En la parte superior derecha de la figura 41 C se muestra mediante histograma de frecuencias la subida en porcentaje respecto del primer intervalo, del segundo, tercero, cuarto, quinto y de la frecuencia máxima (representado en la figura como 1,2,3,4,5 y f.m.), así como el error típico establecido en la determinación de la media. En la gráfica se observa una subida paulatina de la media de cada grupo hasta el quinto intervalo donde prácticamente se alcanzó la frecuencia máxima.

La figura 41 Ax muestra la evolución de las frecuencias instantáneas de disparo que presentó una motoneurona axotomizada, tomándola en supuestos análogos a los considerados para las controles. Las motoneuronas lesionadas evidenciaron un agotamiento prematuro en la cinética de brote de actividad que acompaña a los

movimientos sacádicos, ya que su frecuencia máxima se alcanzó durante el segundo o tercer intervalo, cayendo gradualmente después. Además, se encontró que la frecuencia máxima fue sensiblemente inferior a la de las controles. Los ejemplos que se muestran en la figura 41 Ax se tomaron en una motoneurona 40 días después de su lesión a nivel central, ya que en las motoneuronas sometidas a lesión a nivel periférico el efecto de agotamiento prematuro fue menos evidente.

En la parte superior derecha de la figura 41 Ax se muestra mediante histograma de frecuencias el porcentaje de subida respecto del primer intervalo, de los cinco primeros intervalos y de la frecuencia máxima (f.m. en la figura). Dichos datos se obtuvieron en una motoneurona axotomizada centralmente para un total de 20 movimientos sacádicos. También se muestra el error típico establecido en la determinación de la media. En la gráfica los fenómenos anteriormente citados, es decir, el agotamiento prematuro (la media de los intervalos cuarto y quinto es menor que la del tercero) en el incremento de la frecuencia de disparo y la disminución de la frecuencia máxima media. El error típico en la determinación de la media fue sensiblemente mayor durante el tercer intervalo (marcado con estrella en la figura) dado que durante dicho intervalo la frecuencia fue muy variable aumentando o disminuyendo en relación al segundo intervalo sin seguir un patrón definido. El valor

de la media para los intervalos segundo y tercero fue similar al encontrado en las controles (aunque con tendencia a disminuir en el tercero).

Las relaciones lineales que se encontraron entre cada una de las frecuencias de los cinco primeros intervalos y la frecuencia máxima que se alcanzó en el movimiento se muestran en la figura 42 para cada uno de los supuestos experimentales. En la figura 42 CA se presenta la ecuación lineal que define las frecuencias esperadas (F_1) para la motoneurona representada durante el primer intervalo. Los valores del primer intervalo se tomaron de los 20 movimientos estudiados. La correlación que se obtuvo fue de 0,9, lo que implica que en la consecución de su frecuencia máxima las motoneuronas del núcleo motor ocular externo siguen una estrategia marcada desde el primer intervalo. En la figura 42 CB se muestran las relaciones lineales de los cinco primeros intervalos frente a la frecuencia máxima alcanzada durante cada movimiento sacádico. Las pendientes de estas rectas aumentaron gradualmente para cada uno de los intervalos (0,54; 0,60; 0,81; 0,86 y 0,93) siendo 1, lógicamente frente a ella misma (línea de trazos en la figura). Hay que hacer notar la adición del valor umbral del intervalo de mayor frecuencia a la recta de frecuencia máxima para una mejor comprensión de la figura. Las motoneuronas sometidas a axotomía periférica (figura 42 AxP) mostraron el mismo fenómeno de predeterminación por el

primer intervalo mediante una relación lineal, pero evidenciaron una lenta caída en las pendientes una vez rebasado el segundo intervalo (0,50; 0,90; 0,84; 0,80 y 0,68). Efectos similares pero mucho más pronunciados se obtuvieron cuando las motoneuronas se sometieron a axotomía central (Fig. 42 AxC), en este caso la pendiente disminuyó a la mitad desde el segundo al quinto intervalo (0,41; 0,91; 0,70; 0,47 y 0,43). El coeficiente de correlación medio que se obtuvo entre las frecuencias de cada uno de los cinco intervalos y la frecuencia máxima para los tres supuestos experimentales fue de 0,94.

Las relaciones lineales que se encontraron entre las frecuencias de los cinco primeros intervalos y la velocidad máxima que se alcanzó en el movimiento se muestran en la figura 43 en cada uno de los supuestos experimentales. En la figura 43 CA se presenta la ecuación lineal de las frecuencias esperadas para el primer intervalo en una motoneurona control, así como los valores experimentales con los que se estableció la relación. El coeficiente de correlación fue de 0,7. Esto implica que la consecución de la velocidad ocular máxima estuvo determinada desde el primer intervalo. En la figura 43 CB se representan las relaciones lineales establecidas para una motoneurona control entre los cinco primeros intervalos y la frecuencia máxima con la velocidad ocular máxima del movimiento sacádico. En dicha figura se muestra como aumentan

progresivamente las pendientes. La velocidad ocular máxima en los animales axotomizados se midió en el ojo contralateral, basándose en el hecho de que el sistema motor ocular es prácticamente simétrico (Baker y Spencer, 1981). Las motoneuronas lesionadas mostraron un decaimiento tanto del umbral como de las pendientes, tras el segundo intervalo. Este fenómeno fue más acentuado cuando la axotomía se realizó centralmente (figura 43 AxC). El coeficiente de correlación medio que se obtuvo entre las frecuencias de cada uno de los cinco primeros intervalos y la velocidad máxima fue de 0,69, lo que implica un peor ajuste de los intervalos con la velocidad máxima con referencia a la frecuencia máxima. Esto se debe a que la velocidad máxima es la salida de toda la planta oculomotora, mientras que la frecuencia máxima representa la salida de la propia neurona analizada.

4.6.4 ANALISIS DE LA BAJADA DE FRECUENCIA DURANTE MOVIMIENTOS SACADICOS: FASE FINAL

Durante los movimientos sacádicos la actividad en ambos tipos de motoneuronas subió progresivamente hasta alcanzar su frecuencia máxima, tal y como se describió en el apartado anterior. Posteriormente, dicha frecuencia descendió progresivamente hasta alcanzar un valor correlacionado con la nueva posición ocular para las motoneuronas controles mientras que en las axotomizadas la actividad se fue perdiendo hasta desaparecer 0,5 seg después del movimiento. La figura 44 muestra la cinética de la caída de la actividad en las motoneuronas axotomizadas (figura 44 Ax), para 4 movimientos diferentes; esta caída se compara con la existente en una motoneurona control (figura 44 C). La gráfica obtenida a través del ordenador reveló en la curva de caída de la actividad dos periodos bien diferenciados. El primero comprende desde el momento en el que se alcanzó la frecuencia máxima de disparo en la motoneurona hasta 0,2 seg después. Durante este primer periodo la caída de actividad fue más importante cuanto mayor fue la frecuencia máxima obtenida, de tal modo que alrededor de 0,2 seg después de conseguirla todas las curvas de actividad tuvieron frecuencias que oscilaron entre 40 y 50

impulsos/seg independientemente de si la curva se inició en 120 o 65 impulsos/seg. El segundo periodo se encontró comprendido desde los 0,2 seg hasta que la actividad desapareció (entre 0,5-0,8 seg) después de la frecuencia máxima. Durante este periodo las diferentes curvas de bajada de la frecuencia mostraron una pendiente similar. La duración del primer y segundo periodo cambió según la motoneurona analizada. Este hecho se encuentra, probablemente, relacionado con las propiedades pasivas de las membranas de dichas motoneuronas.

La figura 45 muestra los histogramas de frecuencias obtenidos durante dos movimientos sacádicos de características similares. En esta figura se observa que la bajada de actividad de las motoneuronas axotomizadas adoptó, en ocasiones, formas exponenciales con altos valores de correlación. La frecuencia en estos histogramas alcanzó valores máximos similares y, curiosamente, las caídas mostraron cinéticas muy parecidas, lo cual está indicado en la figura 45 por las ecuaciones de mejor ajuste exponencial en ambas curvas.

4.6.5 ANALISIS DE LA ACTIVIDAD DURANTE ESTIMULACION VESTIBULAR

Se estudió la actividad de las motoneuronas axotomizadas durante la estimulación sinusoidal del animal en el plano horizontal para un rango de frecuencias entre 0,1 y 3 Hz (figura 46). La actividad de las motoneuronas axotomizadas se encontró estrechamente relacionada con la modulación sinusoidal de la frecuencia de estimulación (de forma similar a la descrita para las controles, Delgado-García y col., 1985 c). En la figura 46 se muestra la evolución del desfase entre la actividad en la motoneurona axotomizada y la posición del ojo derecho, ya que el izquierdo sólo se movió en parte del rango oculomotor, en la órbita. Los puntos indican los valores de desfase obtenidos, y la línea continua marca el ajuste a estos puntos, según la ecuación $\delta = 1/\tan(\omega TN)$ donde δ representa el desfase entre la descarga en la motoneurona y la posición ocular, ω la frecuencia en radianes/seg = $2\pi f$ y TN la constante de tiempo neuronal (r/k) (Skavenski y Robinson, 1973). La constante de tiempo para la motoneurona representada fue de 0,09 seg. Por otro lado, en la figura 46 se muestra el rango de variación, en el desfase, obtenido en las motoneuronas controles (líneas de trazos en la figura). Los resultados indicaron que el desfase en las

motoneuronas axotomizadas fue del mismo orden que en las motoneuronas controles.

Otro aspectos interesantes observados, aunque no cuantificados, fueron los cambios en la frecuencia máxima y número de potenciales de acción para las motoneuronas axotomizadas durante la estimulación vestibular. Las motoneuronas axotomizadas mostraron, generalmente, valores inferiores de frecuencia máxima así como una escasa respuesta en el número de impulsos que se produjeron para un rango de estimulación similar al practicado en las motoneuronas controles.

TABLA I

Resumen de las variantes aplicadas al revelado de la actividad enzimática de la peroxidasa de rábano utilizando tetrametilbenzidina como sustancia cromógena.

Nº de secciones tratadas	Nitrofe.	H ₂ O ₂	GOD	Filtrado	S. Est.	Resultados
20	300 mg	+	-	-	-	++
"	100 "	+	-	-	-	++
"	30 "	+	-	-	-	-
"	10 "	+	-	-	-	-
40	300 "	+	-	+	-	++
"	" "	+	-	-	+	++
"	" "	+	-	+	+	++
"	" "	-	+	-	-	+++
"	" "	-	+	+	-	+++
"	" "	-	+	-	+	+++
"	" "	-	+	+	+	+++

Los signos (+) indican el grado de eficiencia de la actividad enzimática o la presencia de cada una de las variantes en el proceso de revelado de dicha actividad. Los signos (-) indican resultados nulos o la ausencia de la variante en el proceso de revelado de la actividad de la peroxidasa de rábano.

Nitrofe. Nitroferricianuro sódico
H₂O₂ Peróxido de hidrógeno
GOD Glucosa oxidasa
S. Est. Solución Estabilizadora

TABLA II

Resumen de las variantes aplicadas al revelado de la actividad enzimática de la peroxidasa de rábano utilizando diaminobenzidina como sustancia cromógena.

Nº de secciones tratadas	Cl ₂ Co	H ₂ O ₂	GOD	Filtrado	Resultados
20	0,3 %	+	-	-	+
"	0,5 "	+	-	-	++
"	2 "	+	-	-	-
"	5 "	+	-	-	-
40	0,5 "	+	-	+	++
"	" "	-	+	-	++
"	" "	-	+	+	++

Los signos (+) indican el grado de eficiencia de la actividad enzimática o la presencia de cada una de las variantes en el proceso de revelado de dicha actividad. Los signos (-) indican resultados nulos o la ausencia de la variante en el proceso de revelado de la actividad de la peroxidasa de rábano.

Cl₂Co Cloruro de cobalto
H₂O₂ Peróxido de hidrógeno
GOD Glucosa oxidasa

TABLA III

Latencias de activación antidrómica de las motoneuronas controles y axotomizadas periférica y centralmente del núcleo motor ocular externo (ver apartado 4.4 para más detalles).

GRUPO EXPERIMENTAL		LATENCIAS
CONTROL	Nº = 50	
	Media±D.M.	0,66±0,02
	Rango	0,38-0,9
AX. PERIFERICA	Nº = 70	
	Media±D.M.	0,71±0,02
	Rango	0,43-1,1
AX. CENTRAL	Nº = 40	
	Media±D.M.	0,83±0,03
	Rango	0,41-1,6

Las diferencias entre las poblaciones de motoneuronas controles y axotomizadas centralmente son significativas ($p < 0,05$, test de la t de Student).

D.M. Desviación respecto de la media.
 Nº Número de la muestra.

TABLA IV

Sensibilidad a la posición ocular y umbral de actividad para una muestra de la población de motoneuronas del núcleo motor ocular externo desde su axotomía.

Nº de días tras la axotomía	Sensibilidad a la posición k imp/seg/grad	Rango	Coef. correlación r	Umbral de actividad	
				Media	Rango Grados
CONTROL	8,7±2,5*	2-18	0,89±0,02*	3,3D±5,2*	19D 7I
7-30	8,1±2,6*	3-23	0,80±0,04*	3,4D±5,9*	21D 5I
30-90	6,5±3,1*	2-21	0,78±0,04*	1,2D±6,1*	17D 7I
30-365	9,1±2,8*	4-16	0,91±0,02*	3,1D±4,8*	17D 6I

imp = impulsos, seg = segundos, grad = grados, r = coeficiente de correlación, * = desviación típica.

D = a la derecha de la posición del ojo central en la órbita. I = a la izquierda de la posición del ojo central en la órbita.

Figura 1B.- Microfotografías de motoneuronas del núcleo motor ocular externo marcadas con el producto de reacción de la peroxidasa de rábano tras la inyección de la enzima en el músculo recto externo. A, revelado de la actividad enzimática con tetrametilbenzidina como cromógeno y utilizando glucosa oxidasa. B, revelado con diaminobenzidina como cromógeno y cloruro de cobalto como cofactor. La flecha indica la salida del nervio del VI par craneal. C, revelado con diaminobenzidina como cromógeno, la flecha indica los granulos del producto de reacción. rF, rodilla del facial. Barra 100 μ m.

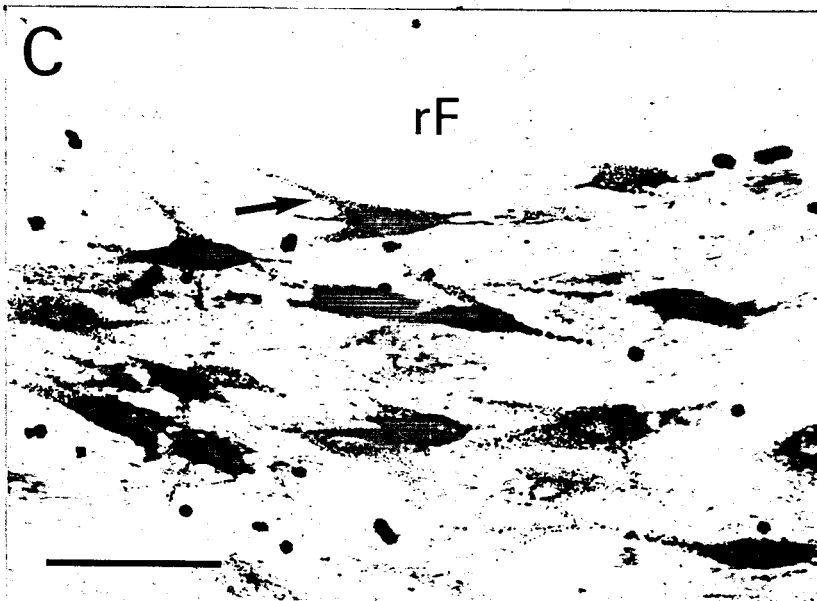


Figura 19.- Composición del núcleo motor ocular externo. A, microfotografía de las motoneuronas del núcleo motor ocular externo principal (parte superior derecha) y accesorio (nMOE acc), marcadas con el producto de reacción de la peroxidasa de rábano tras la inyección de la enzima en el músculo recto externo homolateral. La flecha indica la salida del nervio del VI par. B, microfotografía de las interneuronas del núcleo motor ocular externo marcadas con el producto de reacción de la peroxidasa de rábano tras la inyección de la enzima en el núcleo motor ocular común contralateral. La flecha indica la salida de los axones hacia el fascículo longitudinal medial. C, microfotografía mostrando en detalle las agrupaciones formadas por las interneuronas del núcleo motor ocular externo. a, axón; Mn, motoneurona; rF, rodilla del facial. Barra 50 μ m.

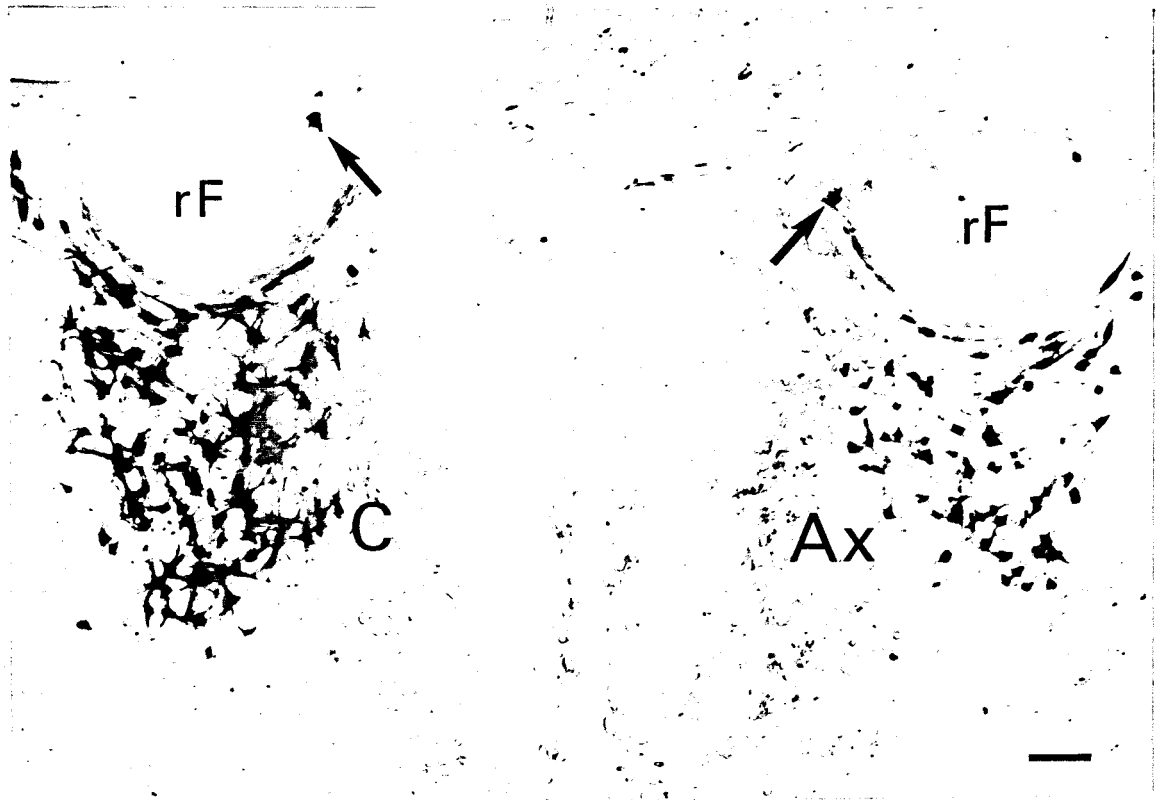


Figura 20.- Microfotografía mostrando las poblaciones de motoneuronas controles (C) y axotomizadas (Ax) marcadas retrógradamente con el producto de reacción de la peroxidasa de rábano tras la inyección de la enzima en ambos músculos rectos externos. Nótese la pérdida de motoneuronas marcadas tras la axotomía del VI par craneal. La flecha indica la presencia de neuronas ectópicas. rF, rodilla del facial. Barra 100 μ m.

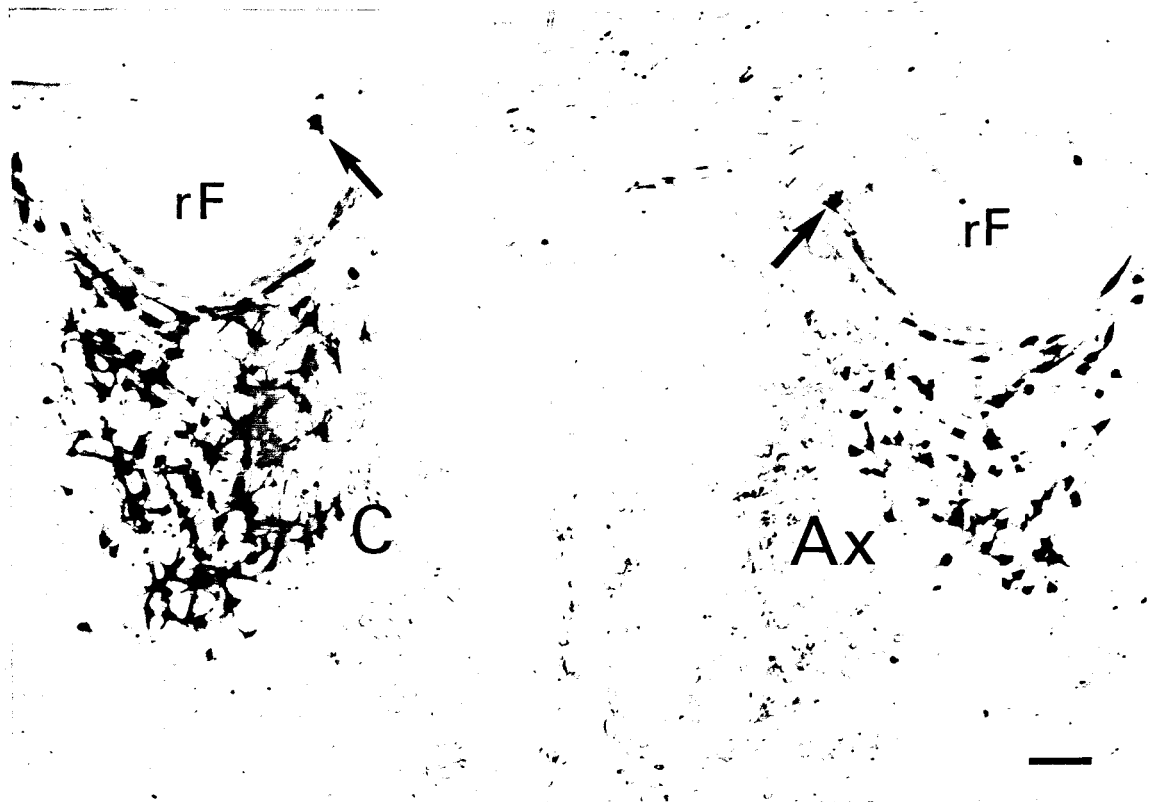
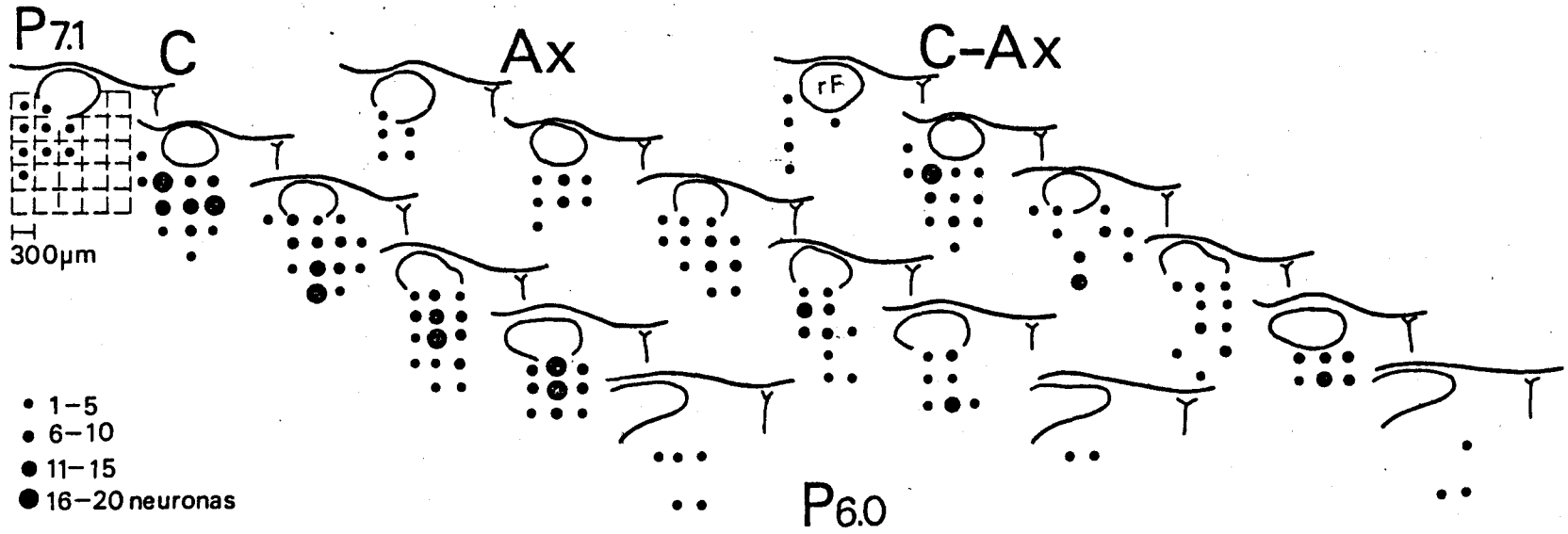


Figura 21.- Diagrama compuesto de secciones coronales a través del núcleo motor ocular externo mostrando la densidad de motoneuronas controles (C) y axotomizadas (Ax) marcadas retrógradamente con el producto de reacción de la peroxidasa de rábano tras la inyección de la enzima en ambos músculos rectos externos. C-Ax, diferencia en la concentración de motoneuronas control y axotomizadas. Los puntos representan el número de motoneuronas marcadas en un área de 0,09 mm². Coordenadas: distancia en mm de acuerdo con el atlas de Berman (1968). rF, rodilla del facial.



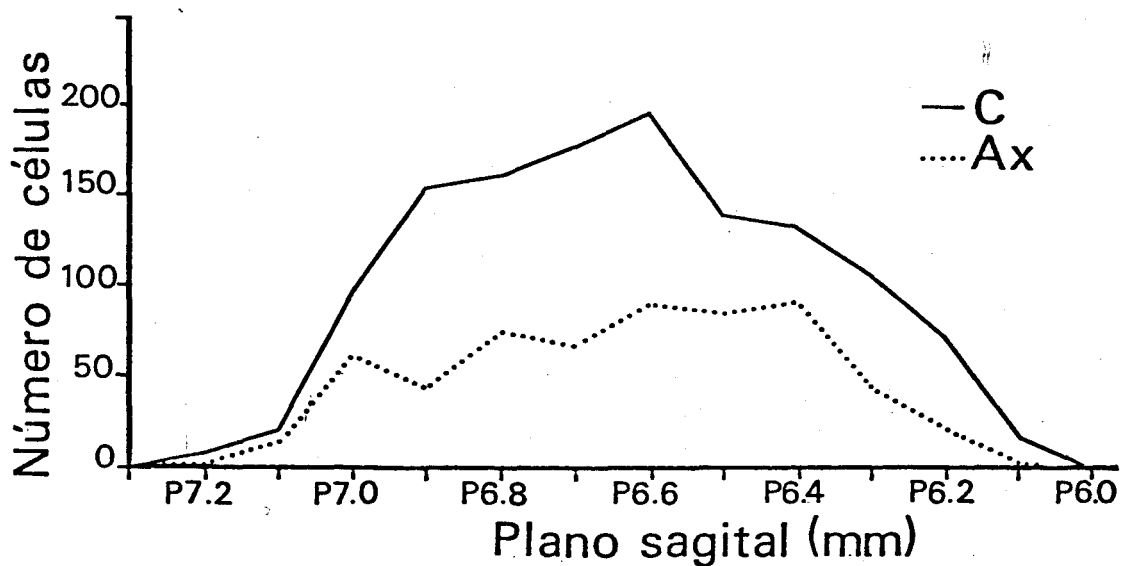


Figura 22.- Distribución en el plano sagital de las motoneuronas controles (C) y axotomizadas (Ax) del núcleo motor ocular externo marcadas retrógradamente con el producto de reacción de la peroxidasa de rábano tras la inyección de la enzima en ambos músculos rectos externos. Abscisas: coordenadas en mm de acuerdo con el atlas de Berman (1968).

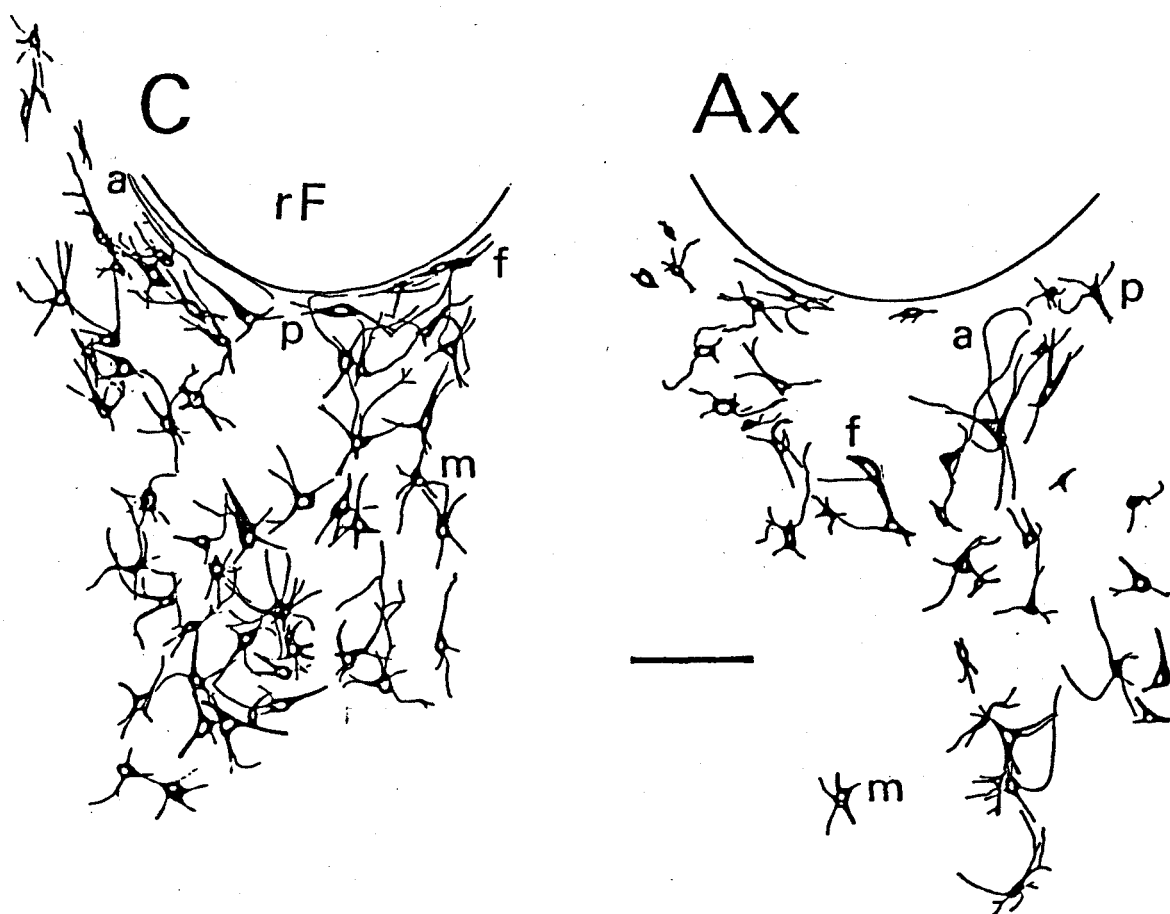


Figura 23.- Reconstrucción con ayuda de la cámara clara de una sección coronal del núcleo del motor ocular externo mostrando las motoneuronas controles (C) y axotomizadas marcadas retrógradamente con el producto de reacción de la peroxidasa de rábano, tras la inyección de la enzima en ambos músculos rectos externos. Nótese la presencia en ambos dibujos de somas neuronales con forma multipolar (m), fusiforme (f) y piramidal (p). a, axón. Barra 150 μ m.

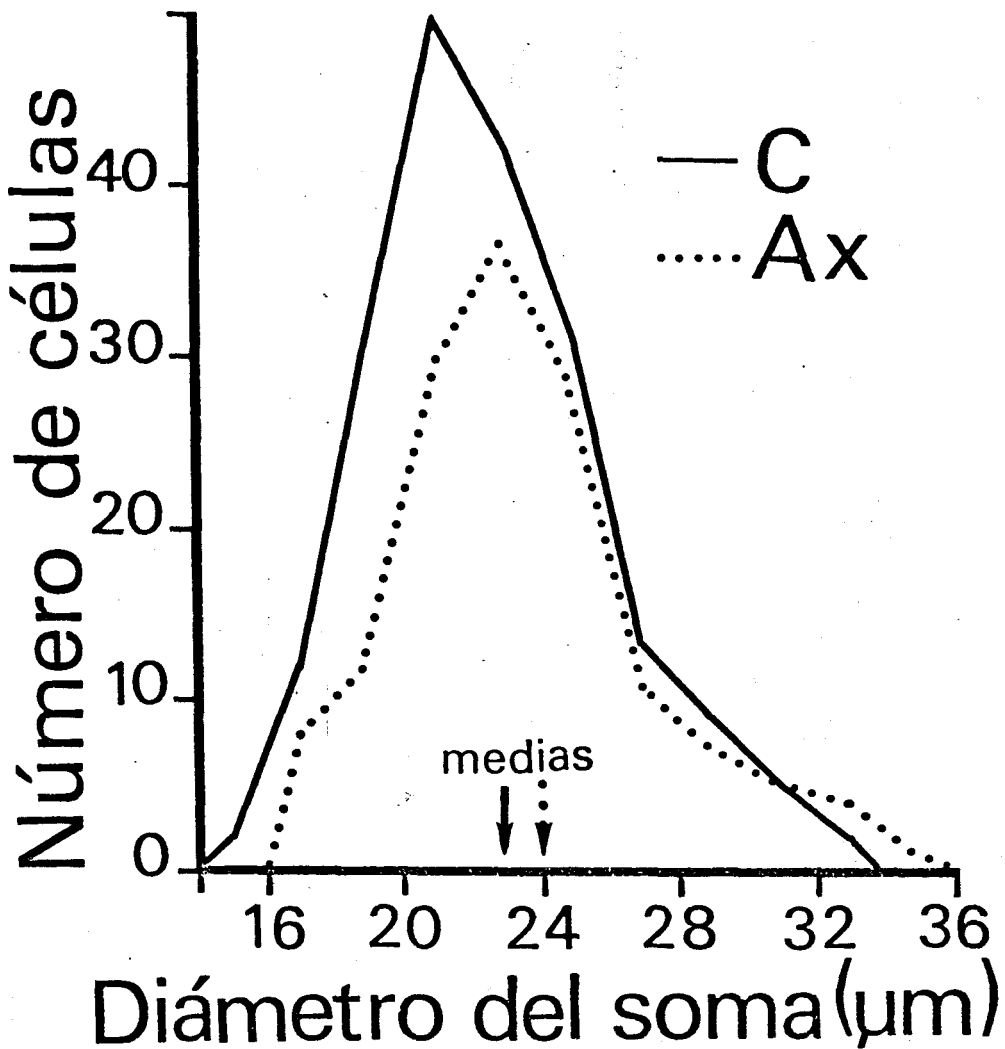


Figura 24.- Distribución del tamaño del soma en las motoneuronas controles (C) y axotomizadas (Ax) del núcleo motor ocular externo marcadas retrógradamente con el producto de reacción de la peroxidasa de rábano tras la inyección de la enzima en ambos músculos rectos externos. Nótese que la media de ambas poblaciones de motoneuronas muestran valores similares.

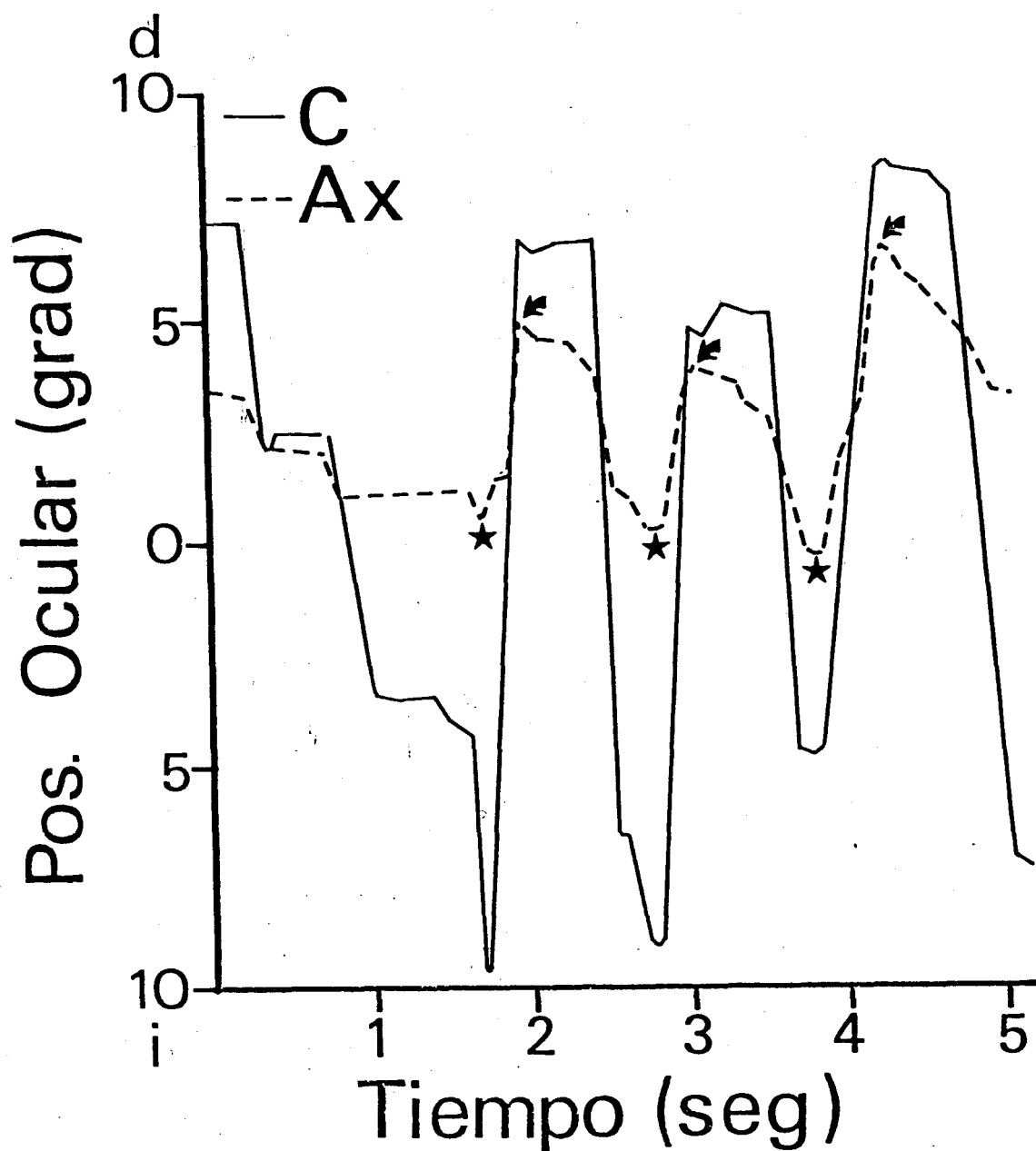


Figura 25.- Características de las fijaciones y movimientos espontáneos hacia la izquierda (i) y derecha (d) del ojo control (C) y lesionado por la axotomía (Ax) del VI par craneal. Véase la incapacidad del ojo lesionado para alcanzar posiciones a la izquierda de 0° (estrellas) y de mantener fijaciones estables en su rango oculomotor (flechas curvadas).

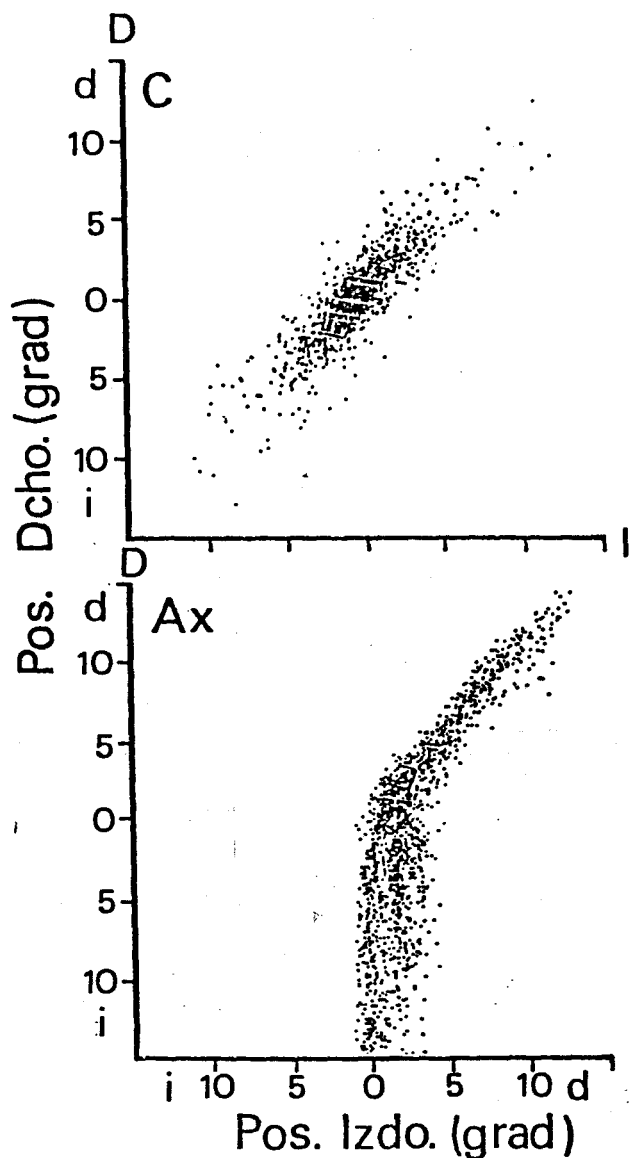


Figura 26.- Representaciones donde se enfrentan la posición instantánea del ojo derecho (D) (ordenadas) e izquierdo (I) (abscisas) para adquisiciones de larga duración (5 minutos). En la parte superior, representación en el animal control (C); en la parte inferior, representación en el animal sometido a axotomía (Ax) del VI par craneal en el ojo izquierdo. Nótese la incapacidad del ojo lesionado de alcanzar posiciones hacia la izquierda (i) de 0°. d, derecha.

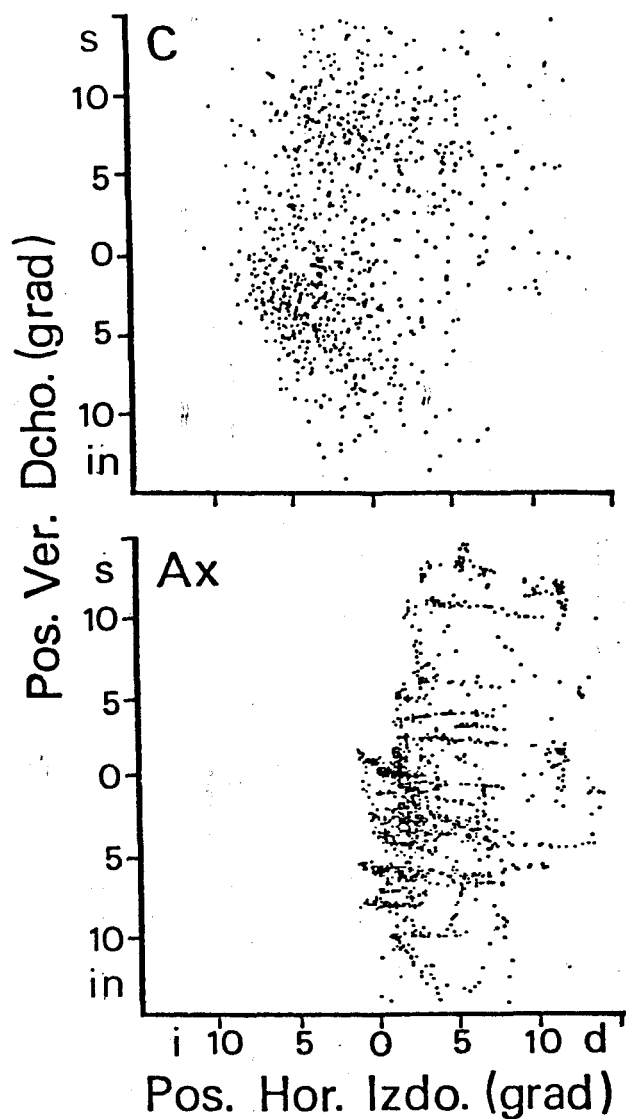


Figura 27.- Representaciones donde se enfrentan la posición instantánea en el plano vertical (ordenadas) y horizontal (abscisas) del ojo derecho, control (c), e izquierdo, lesionado por axotomía (Ax) del VI par craneal. Nótese que los movimientos en el ojo lesionado sólo se afectan en el plano horizontal. d, i, derecha e izquierda; s, in, superior e inferior.

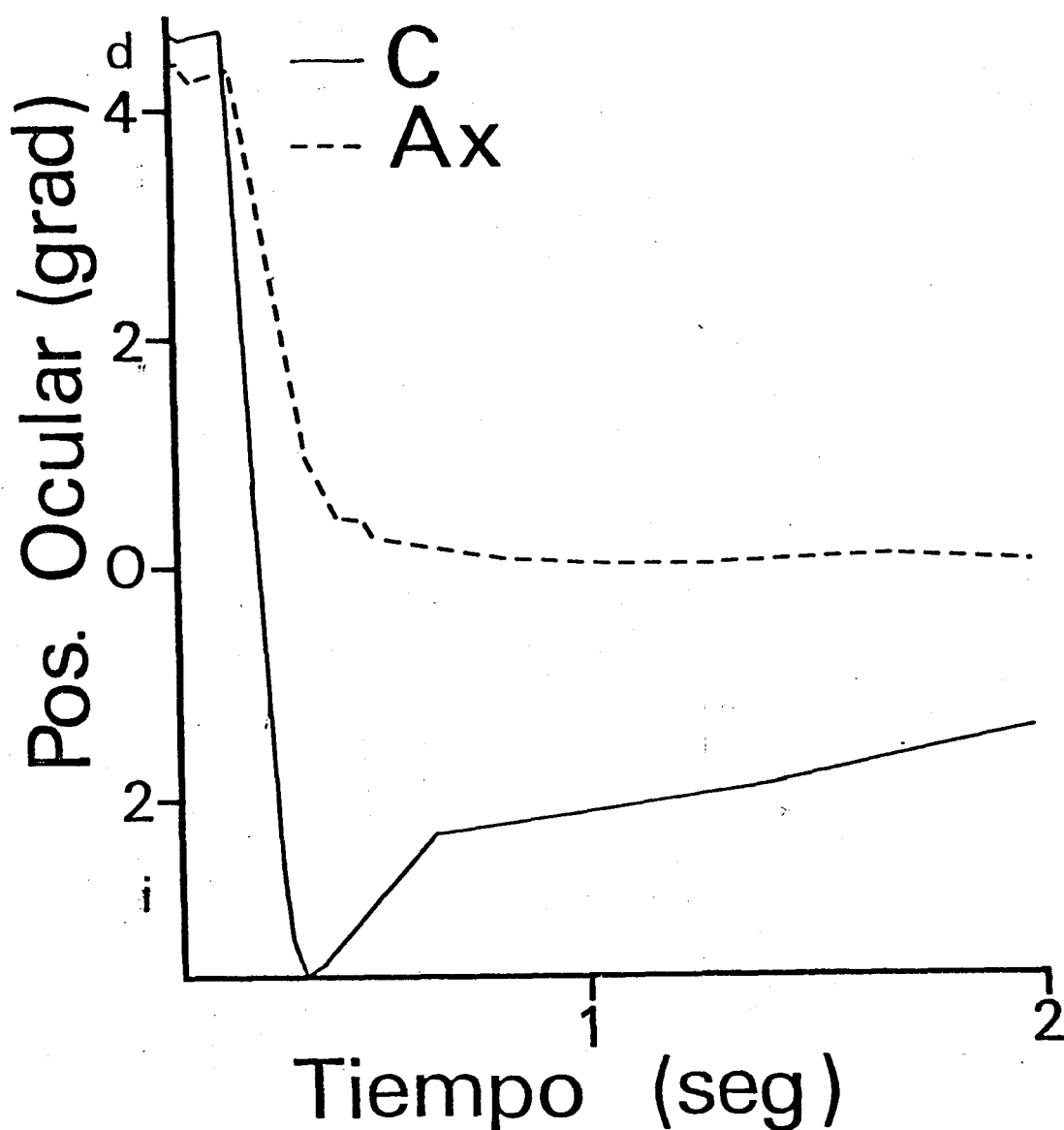


Figura 28.- Representación de la posición instantánea del ojo control (C) y lesionado por axotomía (Ax) del VI par craneal. Nótese el paulatino deslizamiento con que responde el ojo control cuando el lesionado fue incapaz de acompañarlo en el movimiento. d,i, derecha e izquierda.

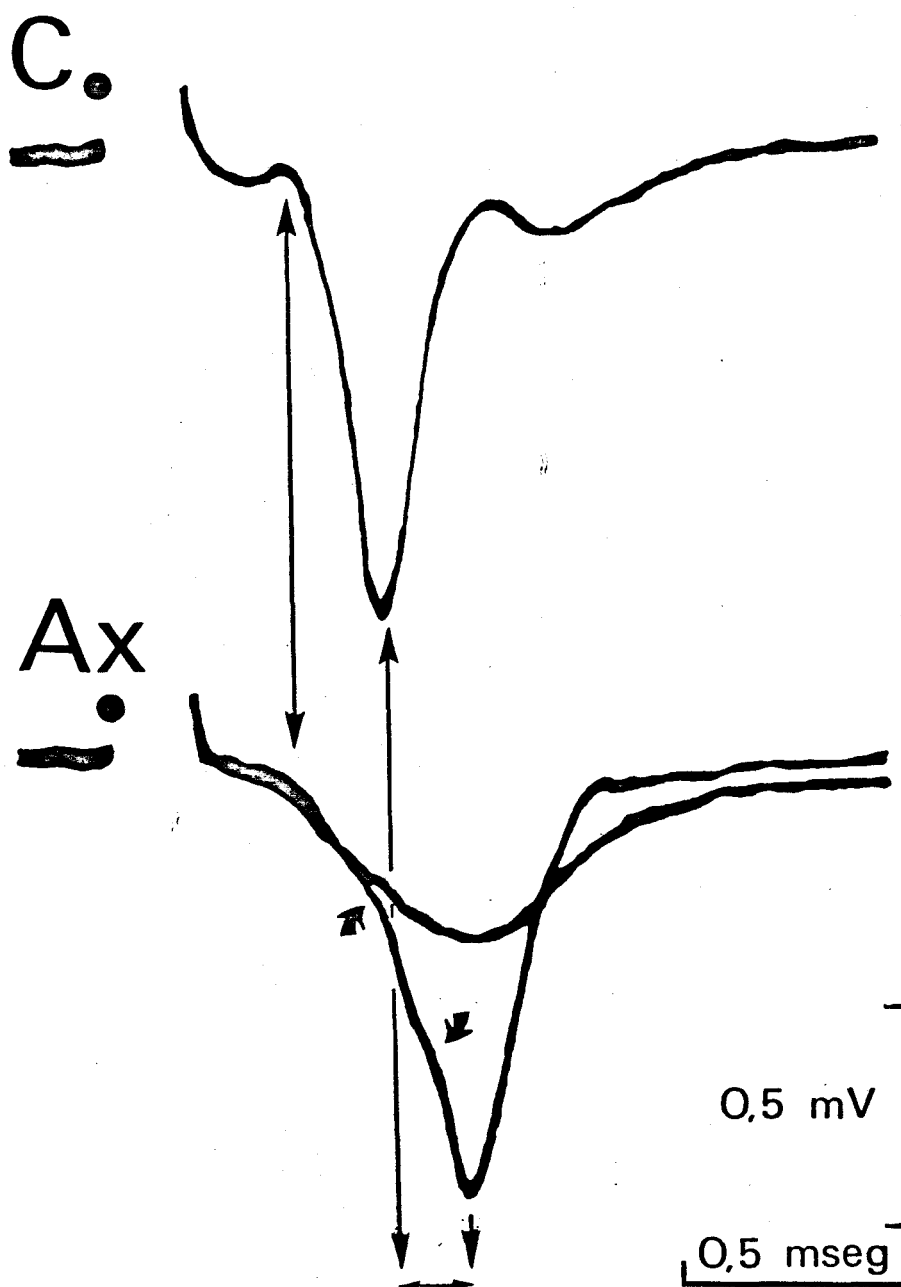


Figura 29.- Activación antidrómica del soma de una motoneurona control (C) y una axotomizada (Ax) del núcleo motor ocular externo. Las dos flechas curvas indican el retraso producido en la invasión del segmento inicial (primera flecha) y del espacio somato-dendrítico (segunda flecha); por otro lado, se aprecia el retraso en alcanzar el primer pico positivo y negativo en la espiga somática de la motoneurona axotomizada (flechas rectas en la figura). El punto indica el comienzo del estímulo. Calibraciones como se indican.

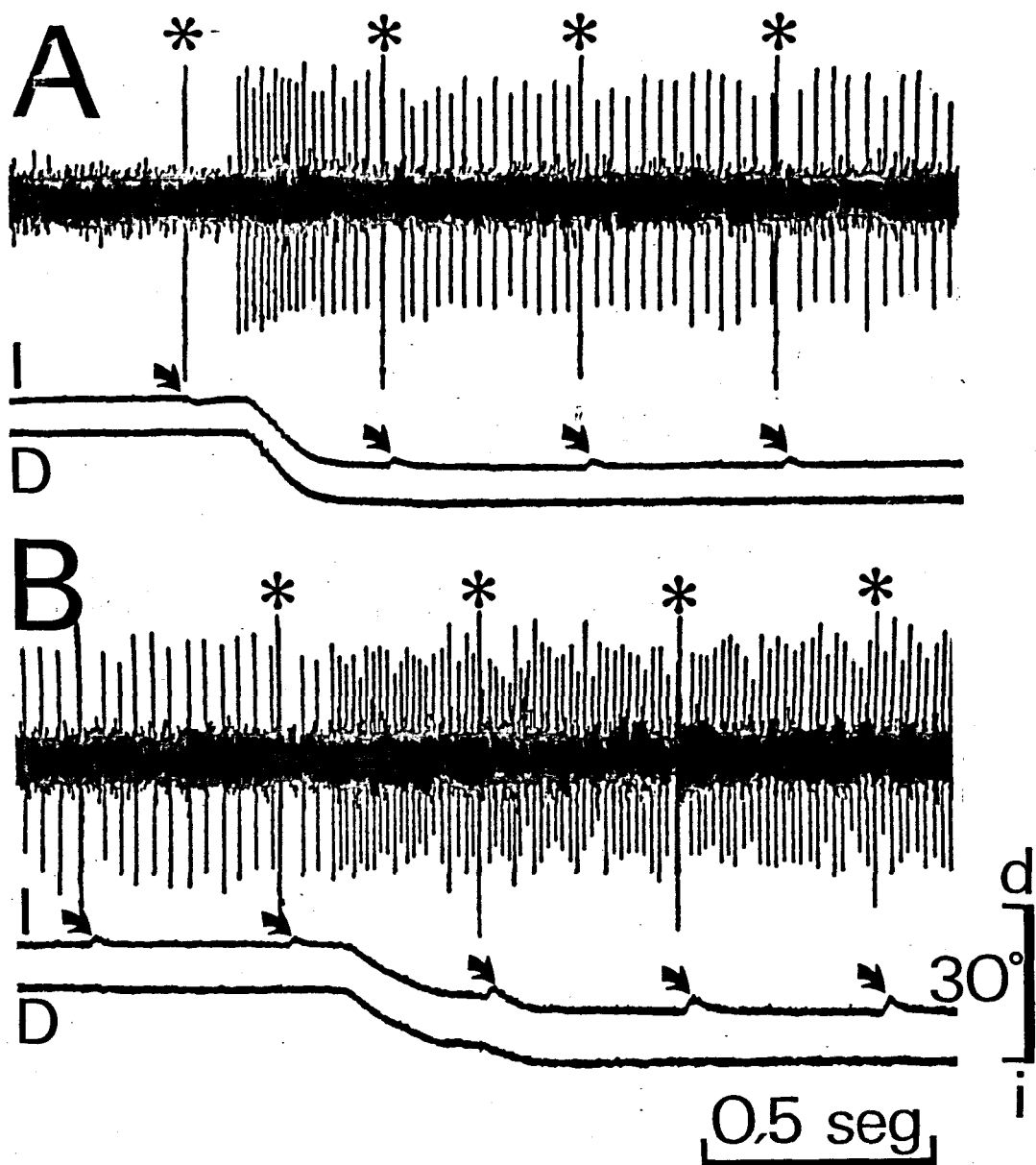


Figura 30.- Actividad de dos motoneuronas controles del núcleo motor ocular externo durante movimientos oculares espontáneos. Nótese que la frecuencia se incrementa con los desplazamientos del ojo izquierdo (I) y derecho (D) hacia la izquierda (i), además se observa que la actividad no aparece en todo el rango oculomotor (A); Los asteriscos indican la activación antidrómica. Las flechas indican el movimiento inducido por la estimulación homolateral del VI par craneal. Calibraciones como se indican.

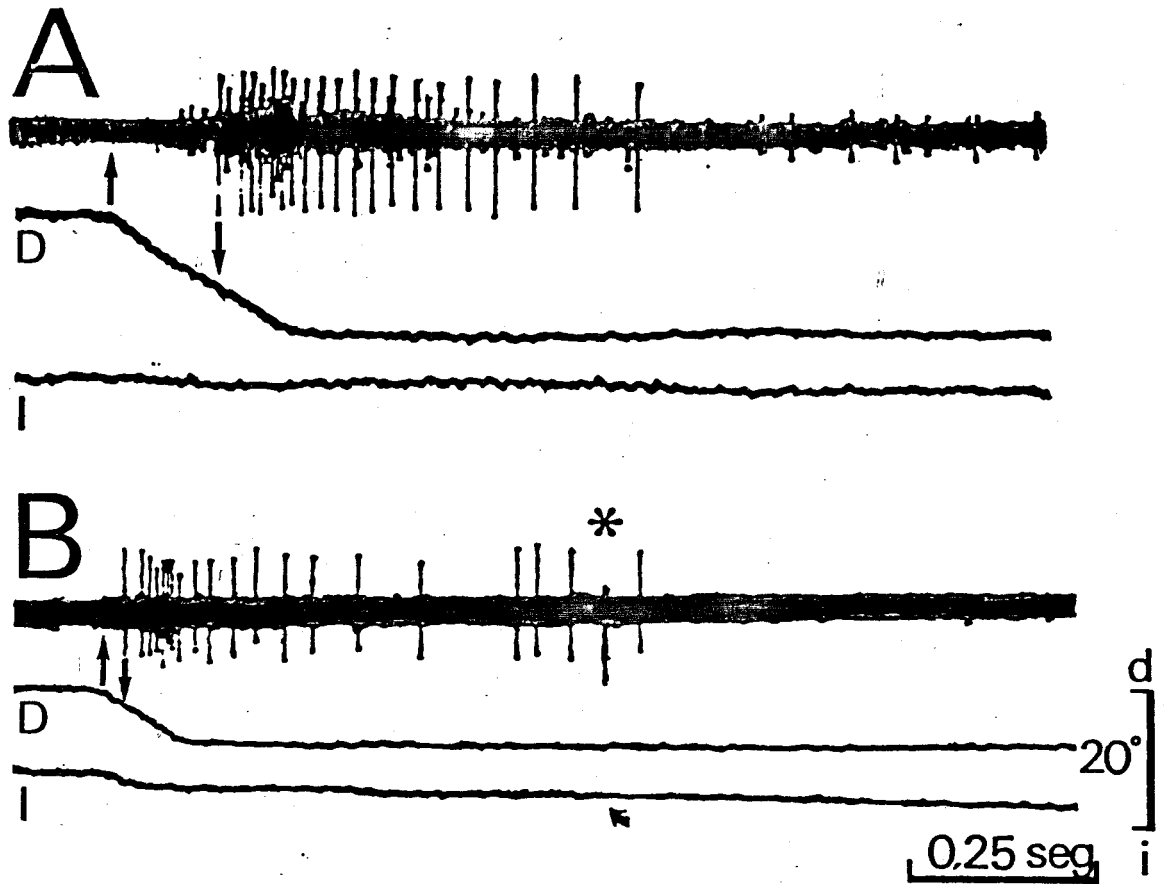


Figura 31.- Actividad de dos motoneuronas axotomizadas del núcleo motor ocular externo durante movimientos oculares espontáneos. Se observa pérdida del componente tónico de disparo, retraso en el inicio de la actividad, ausencia de movimiento en el ojo izquierdo (I) hacia la izquierda (i) e incapacidad de la estimulación del VI par craneal homolateral (asterisco y flecha curva) para invadir antidrómicamente y para producir movimiento en el ojo lesionado (flechas curvas). Las flechas rectas indican el inicio del movimiento del ojo derecho (D) y de la actividad neuronal. Calibraciones como se indican.

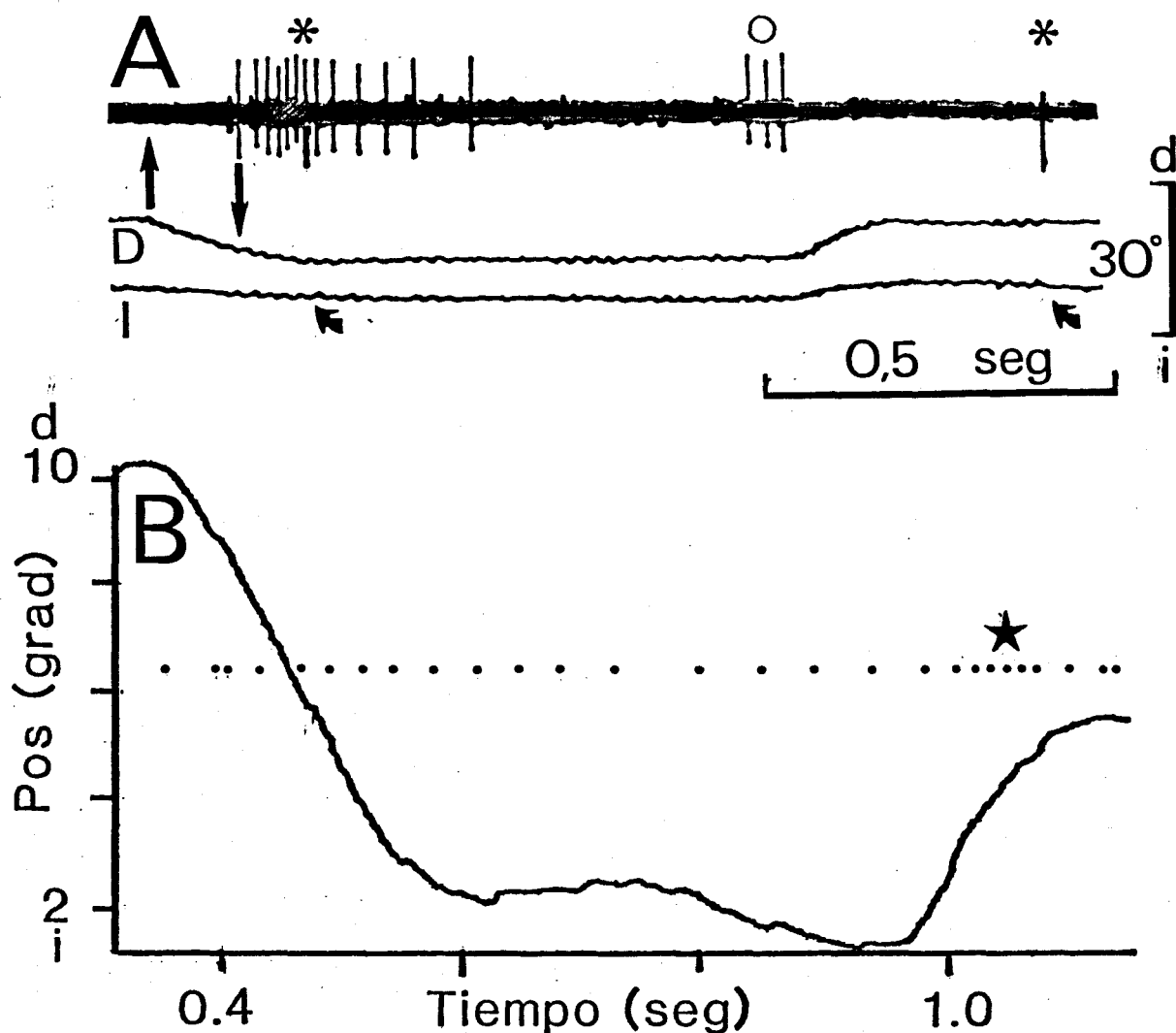


Figura 32.- Actividad de dos motoneuronas axotomizadas del núcleo motor ocular externo durante movimientos oculares espontáneos. Se observa la aparición de pequeños brotes de actividad previo (círculo vacío en A) o durante (estrella en B) el movimiento sacádico. Nótese el retraso en la actividad neuronal (flechas rectas en A) y la pérdida del componente tónico de frecuencia. Los asteriscos indican la estimulación antidrómica desde el VI par craneal homolateral. Las flechas curvas muestran en A la incapacidad de la estimulación antidrómica para inducir movimiento del ojo izquierdo (I). d, i, derecha e izquierda. Calibraciones como se indican.

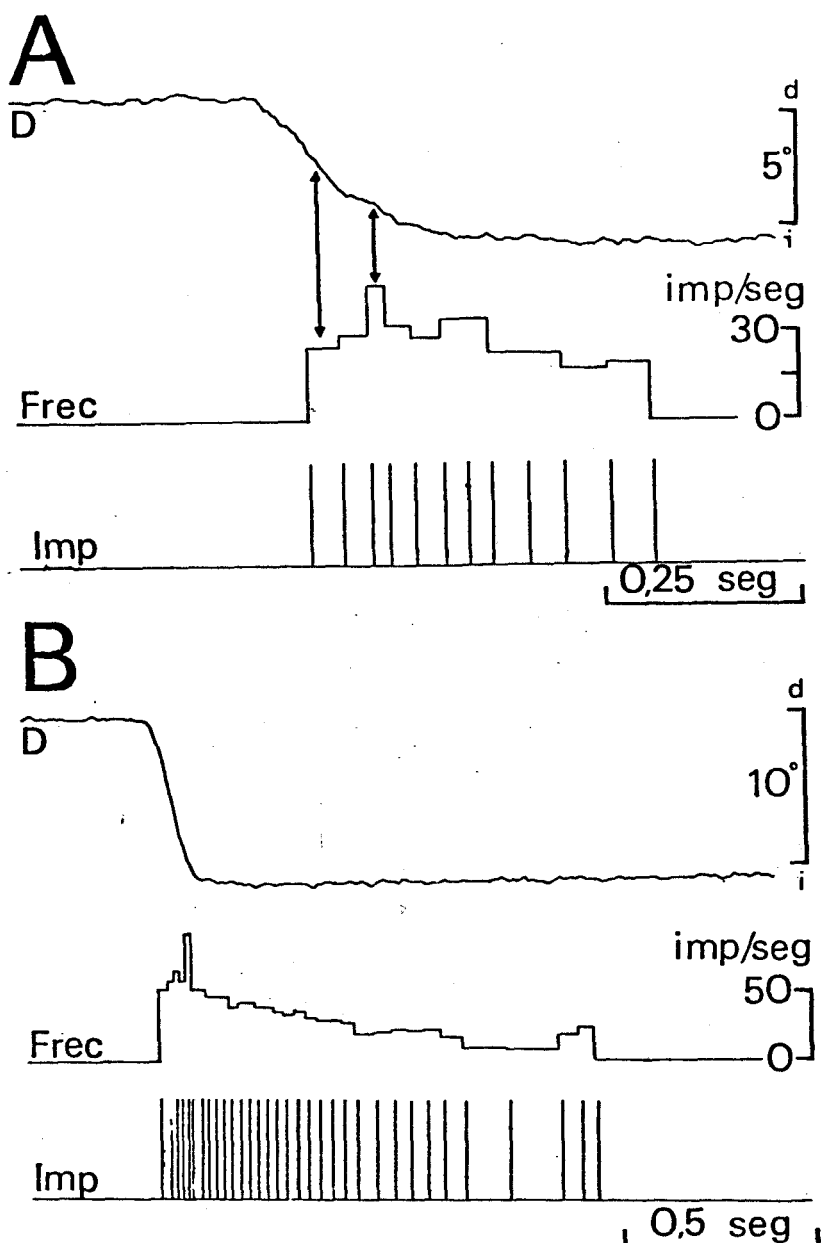


Figura 33.- Histogramas de frecuencia mostrando la actividad de dos motoneuronas, un año después de su axotomía, durante movimientos oculares espontáneos. Véase el retraso en el inicio de la actividad (A) y la lenta caída de la frecuencia tras el movimiento ocular (B). D, ojo derecho; d, i, derecha e izquierda, respectivamente; Frec, frecuencia (impulsos/seg); Imp, representación mediante ordenador de los potenciales de acción producidos por las motoneuronas axotomizadas. Calibraciones como se indican.

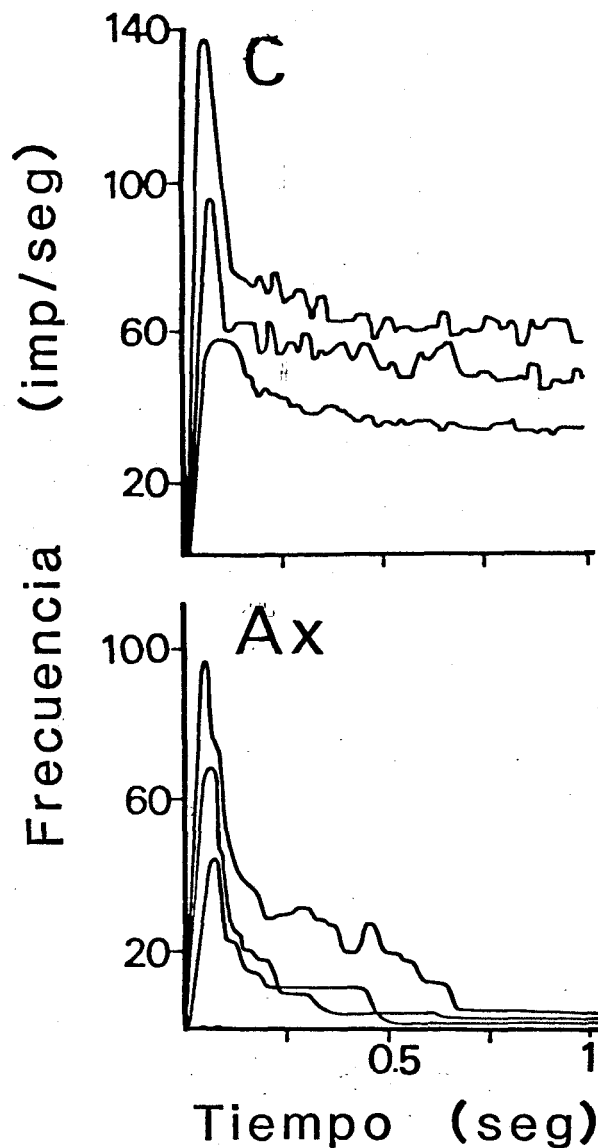


Figura 34.- Cambios en la frecuencia (impulsos/seg) de una motoneurona control (C) y una axotomizada (Ax) durante 3 movimientos sacádicos y sus sucesivas fijaciones, diferentes entre sí y similares para C y Ax. Nótese que las motoneuronas axotomizadas alcanzan menor valor absoluto de frecuencia para los desplazamientos oculares de similares características a los controles.

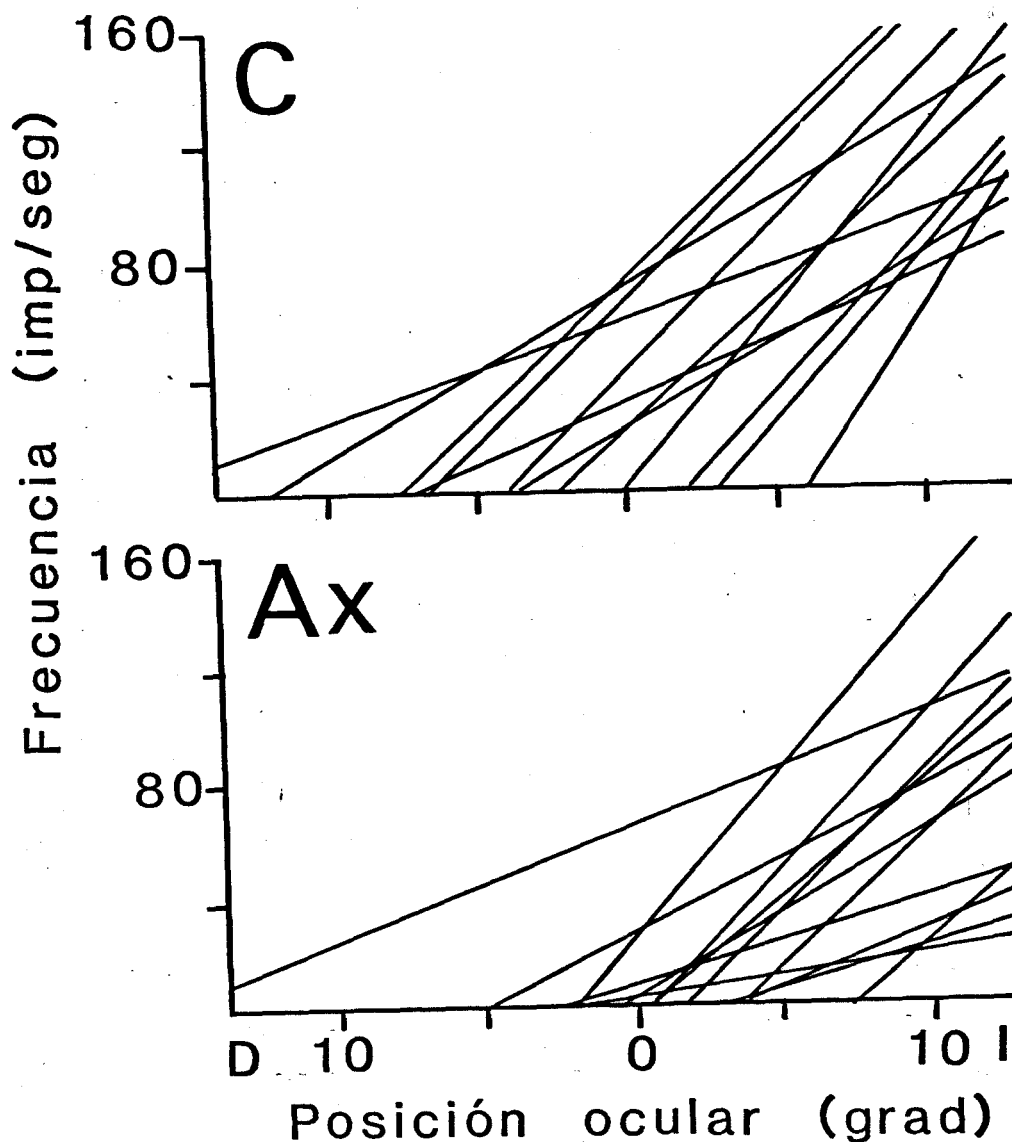


Figura 35.- Gráfica donde se representa las líneas de regresión ajustadas a la relación entre frecuencia de disparo (impulsos/seg) y posición ocular (grados) para una muestra de la población de motoneuronas controladas (C) y axotomizadas (Ax) del núcleo motor ocular externo. Obsérvese la distribución en ambas muestras del umbral de posición (valor de X para $Y=0$), y el parámetro k. D,I, derecha e izquierda, respectivamente.

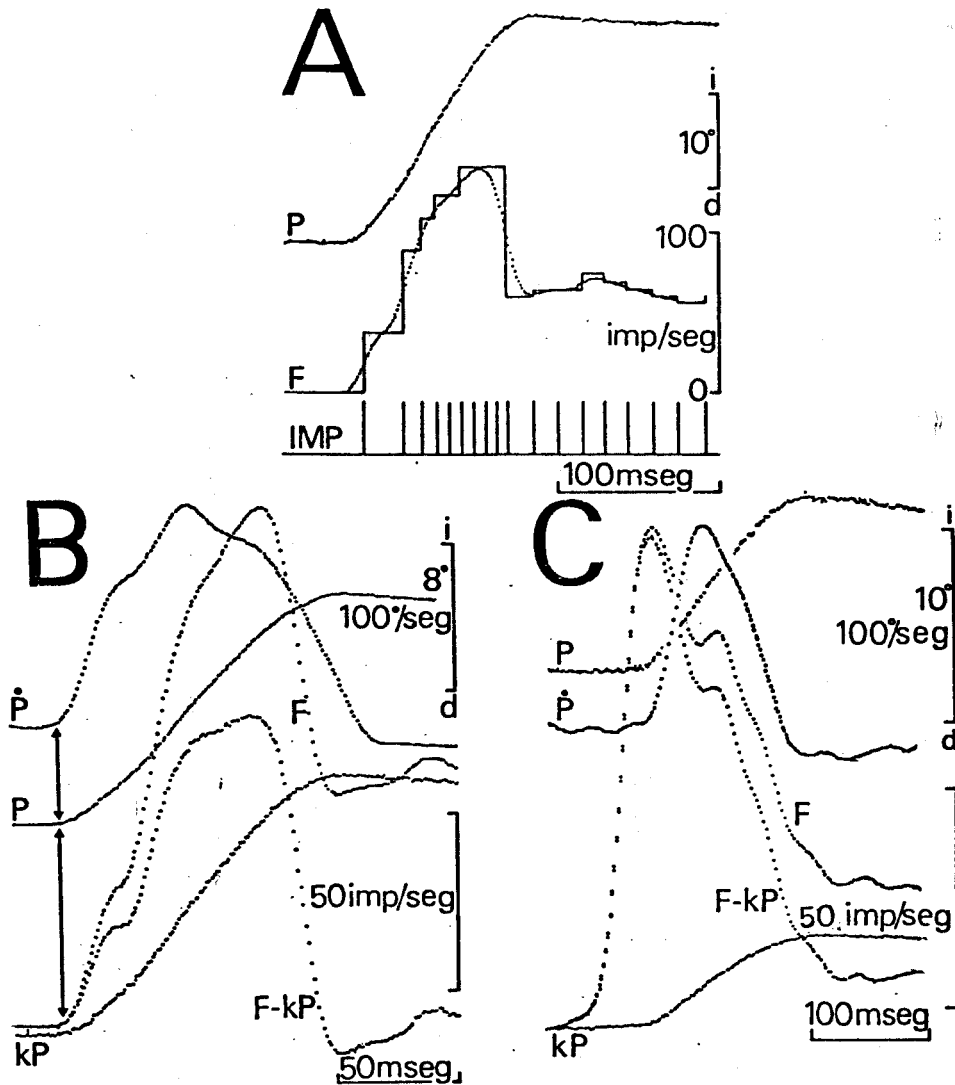


Figura 36.- Histograma de frecuencias con la actividad de una motoneurona control (A y B) y una axotomizada (C) durante movimientos sacádicos en la dirección de activación (izquierda, i). A: representación del histograma de frecuencia y el perfil de éste (F) en la motoneurona. Imp, representación mediante ordenador de los potenciales de acción producidos por la motoneurona durante el movimiento. d, derecha. B: descomposición de la frecuencia de disparo de la motoneurona control en sus componentes. P, posición ocular; \dot{P} , velocidad ocular; F, perfil de la frecuencia de disparo de la motoneurona; kP, componente de posición de la frecuencia; F-kP, frecuencia total menos el componente de posición. C: representación similar a B para una motoneurona axotomizada. Nótese la escasa importancia del componente de posición en la frecuencia total de la motoneurona axotomizada durante el movimiento sacádico. Calibraciones como se indican.

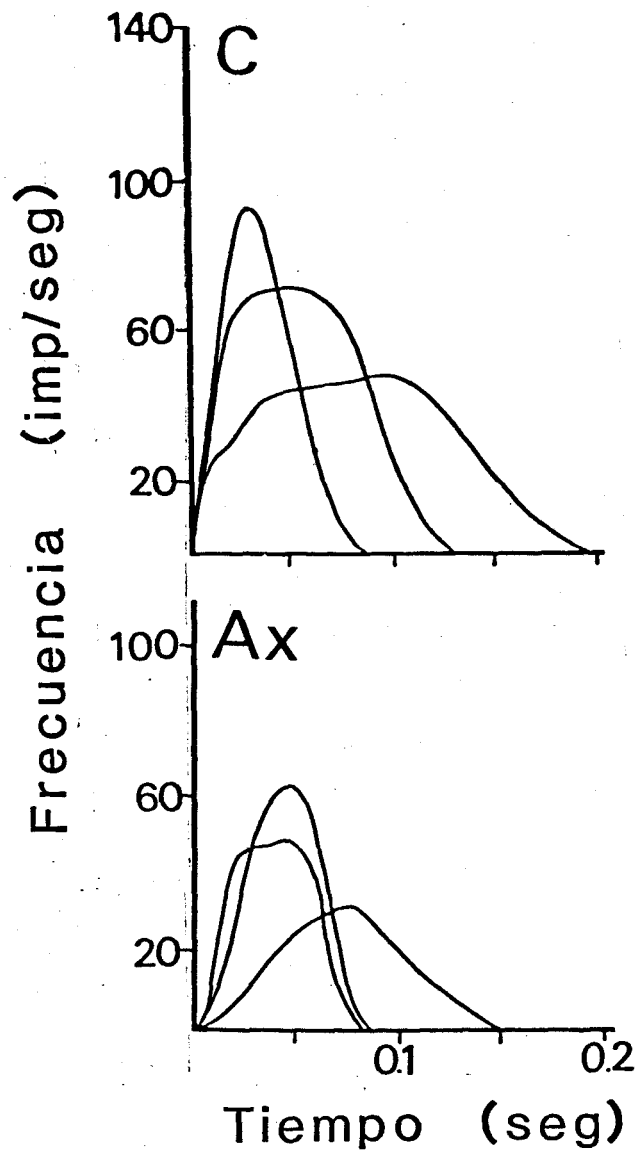


Figura 37.- Evolución del componente de velocidad de la frecuencia (impulsos/seg) de una motoneurona control (C) y una axotomizada (Ax) durante tres movimientos sacádicos diferentes entre sí y similares para C y Ax. Nótese la menor duración y valor absoluto de dicho componente de velocidad en las motoneuronas axotomizadas.

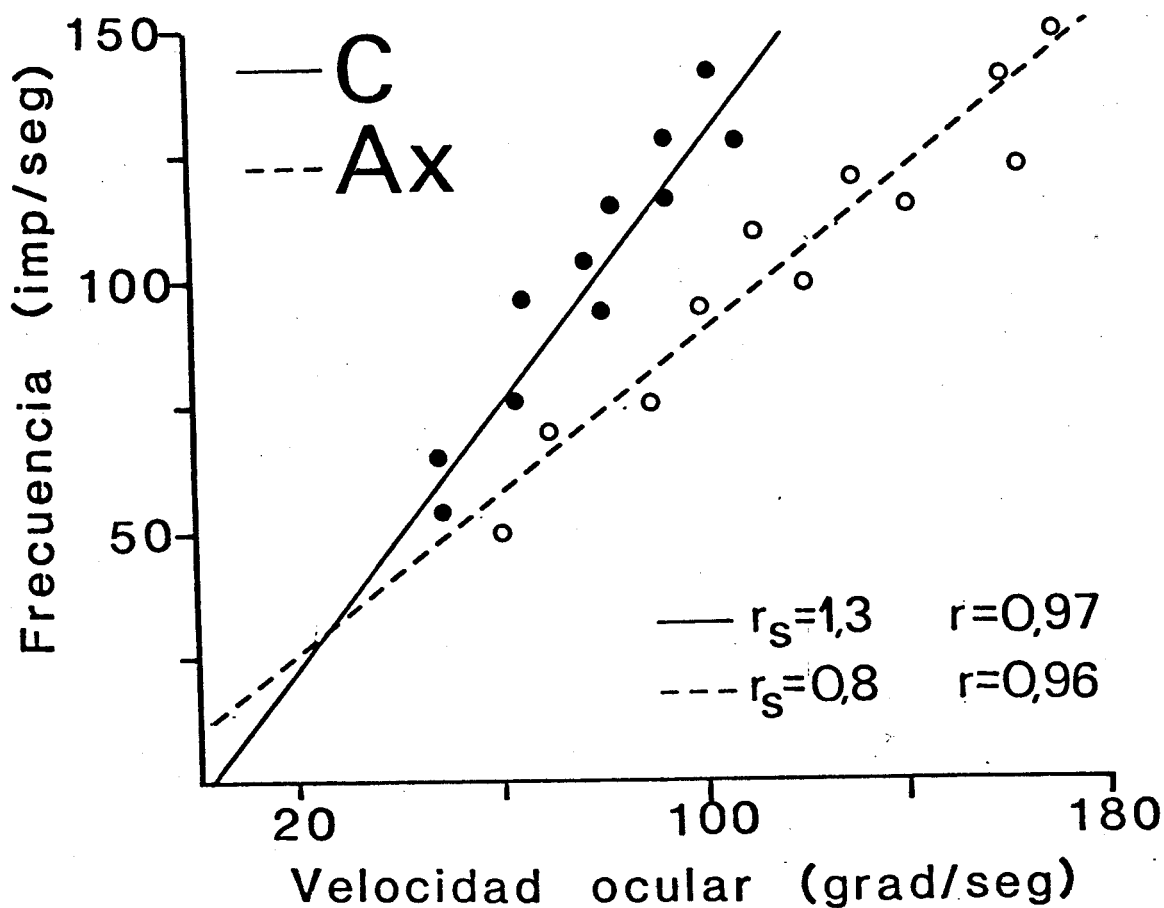


Figura 38.- Gráfica mostrando las relaciones entre la velocidad ocular máxima y la frecuencia máxima obtenida durante distintos movimientos espontáneos para una motoneurona control (C) y una axotomizada (Ax). Los puntos indican los valores reales obtenidos en base a los cuales se determinó la relación; r_s , indica la pendiente de cada recta; r , indica el coeficiente de correlación en cada ejemplo.

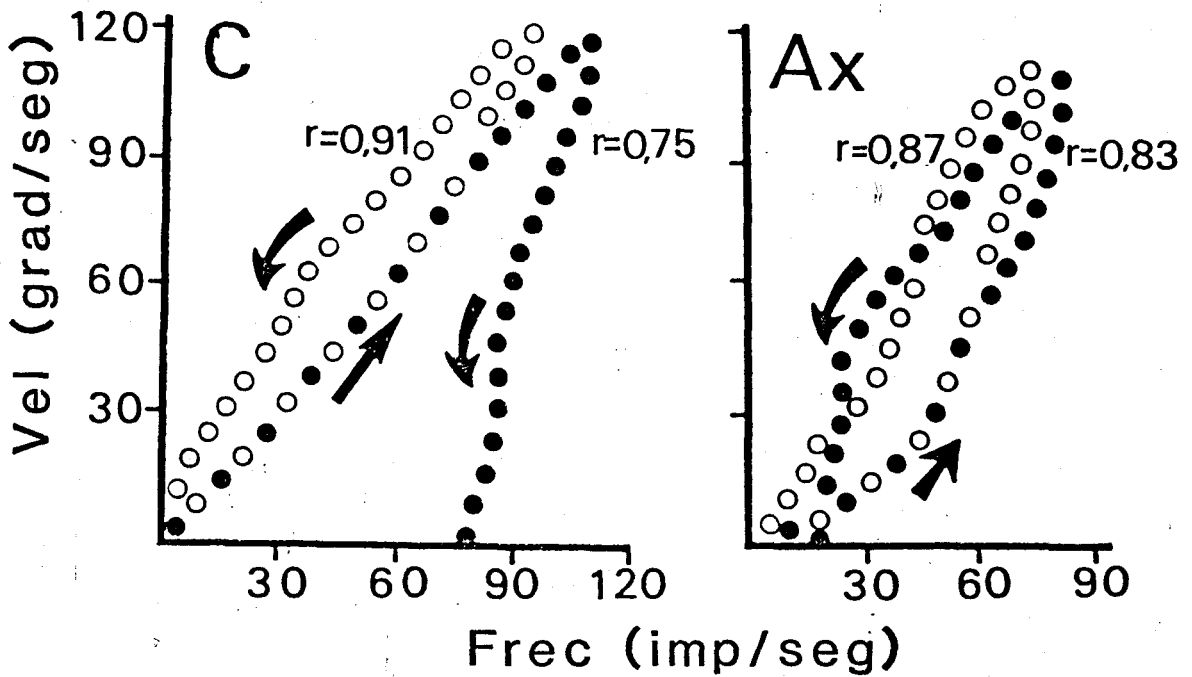


Figura 39.- Relaciones entre la frecuencia de disparo (impulsos/seg) de una motoneurona control (C) y una axotomizada (Ax) del núcleo motor ocular externo y la velocidad ocular (grados/seg) durante un movimiento sacádico. Los puntos rellenos muestran la trayectoria de la frecuencia total de disparo frente a la velocidad ocular. Los círculos vacíos muestran la misma relación tras la sustracción a la frecuencia total del componente de posición. r , coeficiente de correlación lineal para cada representación. Las flechas indican la evolución de la relación durante el movimiento. Nótese que la trayectoria y el coeficiente de correlación apenas varían en las motoneuronas axotomizadas para estas representaciones.

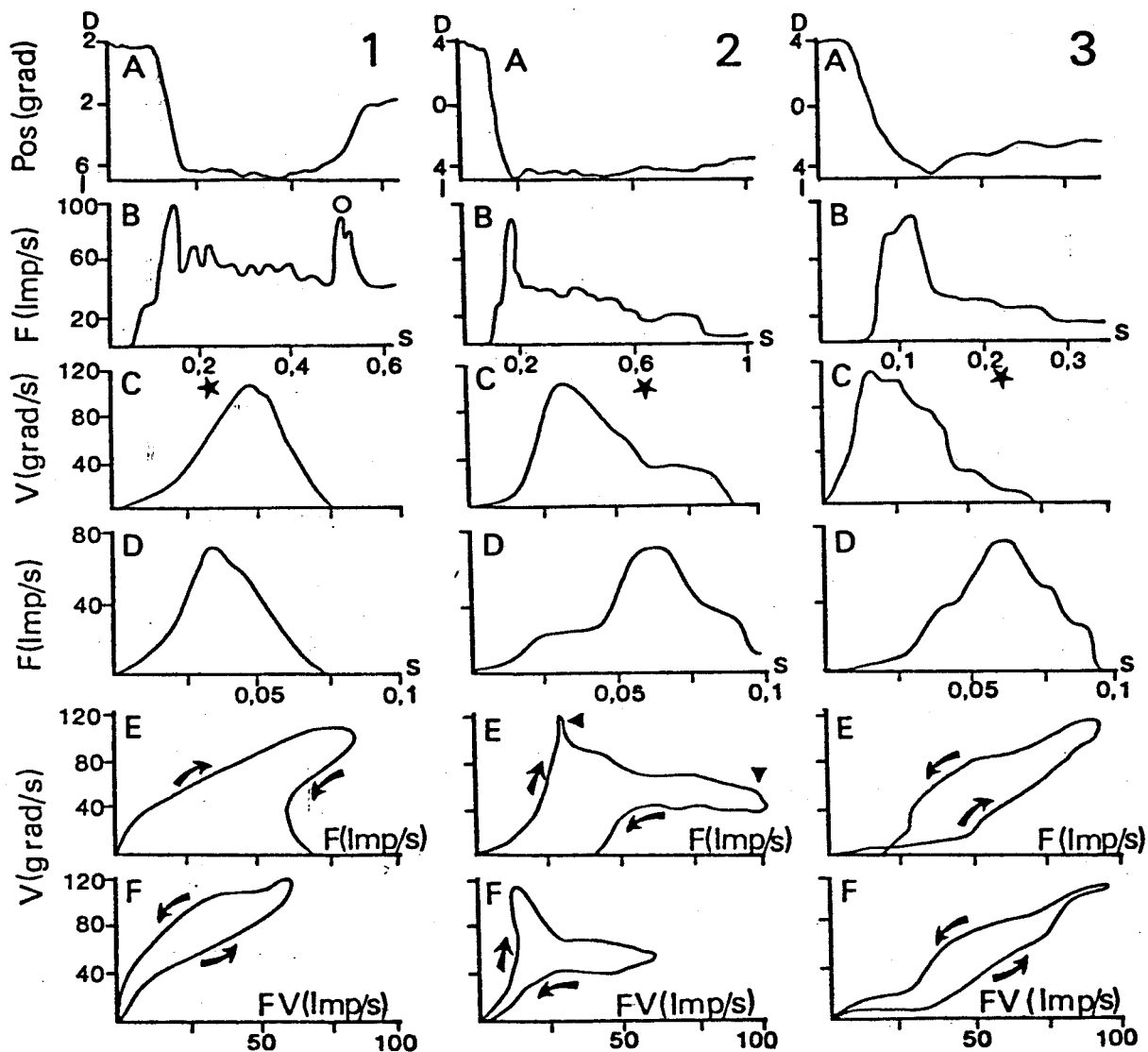


Figura 40.- Actividad de una motoneurona axotomizada del núcleo motor ocular externo durante tres movimientos oculares (1, 2, 3). De arriba a abajo se indican: A, posición ocular (grados); B, frecuencia total de disparo de la motoneurona axotomizada; C, velocidad ocular; D, componente de velocidad de la frecuencia; E, velocidad ocular frente a frecuencia total; F, velocidad ocular frente al componente de velocidad de la frecuencia. El círculo, las estrellas, los triángulos y las flechas indican, respectivamente, la presencia de un brote en la dirección de inactivación, el retraso entre el máximo de velocidad y frecuencia, los máximos de velocidad y frecuencia, y la evolución de las representaciones velocidad ocular frecuencia. Para más detalles ver el texto.

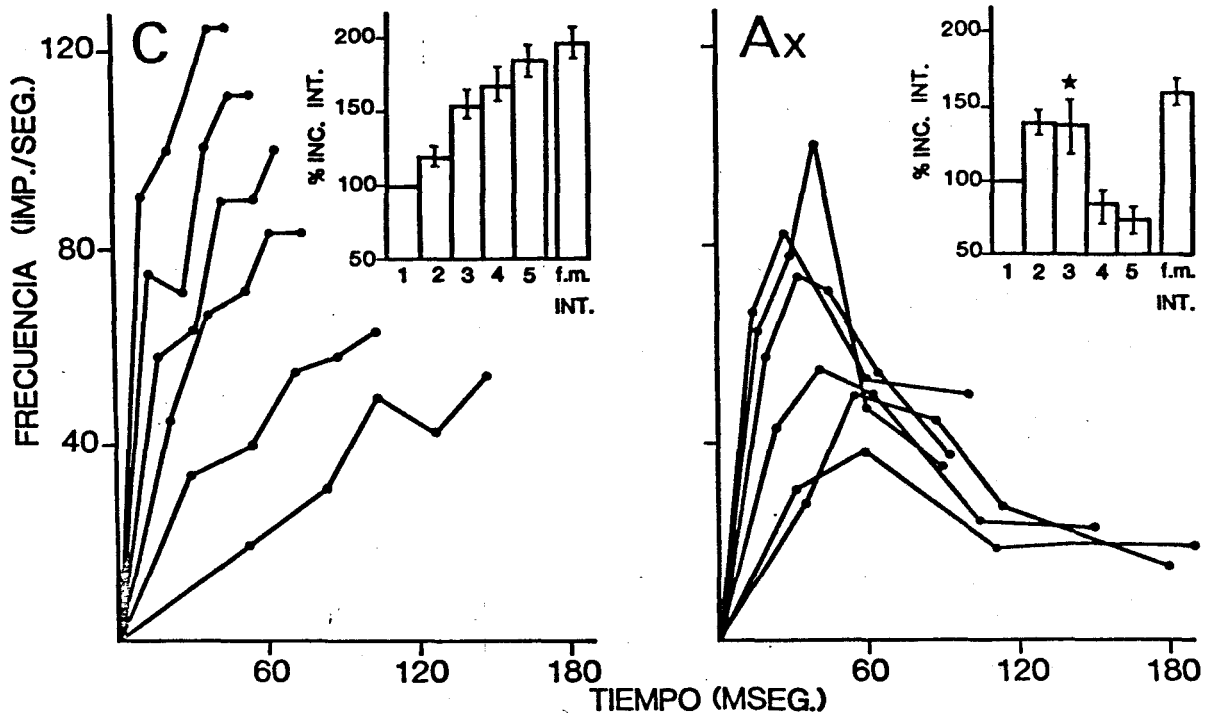


Figura 41.- Evolución de la frecuencia instantánea de disparo de las motoneuronas controles (C) y axotomizadas (Ax) del núcleo motor ocular externo durante movimientos sacádicos. C: cinética de subida de la frecuencia de disparo de una motoneurona control durante 6 movimientos sacádicos. Nótese cómo la frecuencia máxima (f.m.) se alcanza durante el cuarto o quinto intervalo. En la parte superior derecha se muestra el histograma del porcentaje de incremento de la frecuencia de los diferentes intervalos y de f.m. con respecto al primer intervalo (% INC. INT.). Las barras indican el error típico en la determinación de la media. Ax: cinética de subida de la frecuencia de disparo en una motoneurona axotomizada centralmente durante 6 movimientos sacádicos. Nótese cómo la motoneurona alcanza prematuramente su f.m. durante el segundo o tercer intervalo. En la parte superior derecha se muestra el histograma del porcentaje de incrementos de la frecuencia de los diferentes intervalos y de f.m. con respecto al primero. Véase la disminución de la media de los intervalos cuarto y quinto con respecto al tercero. La estrella marca el mayor error típico presente en el tercer intervalo. Ver texto para más detalles.

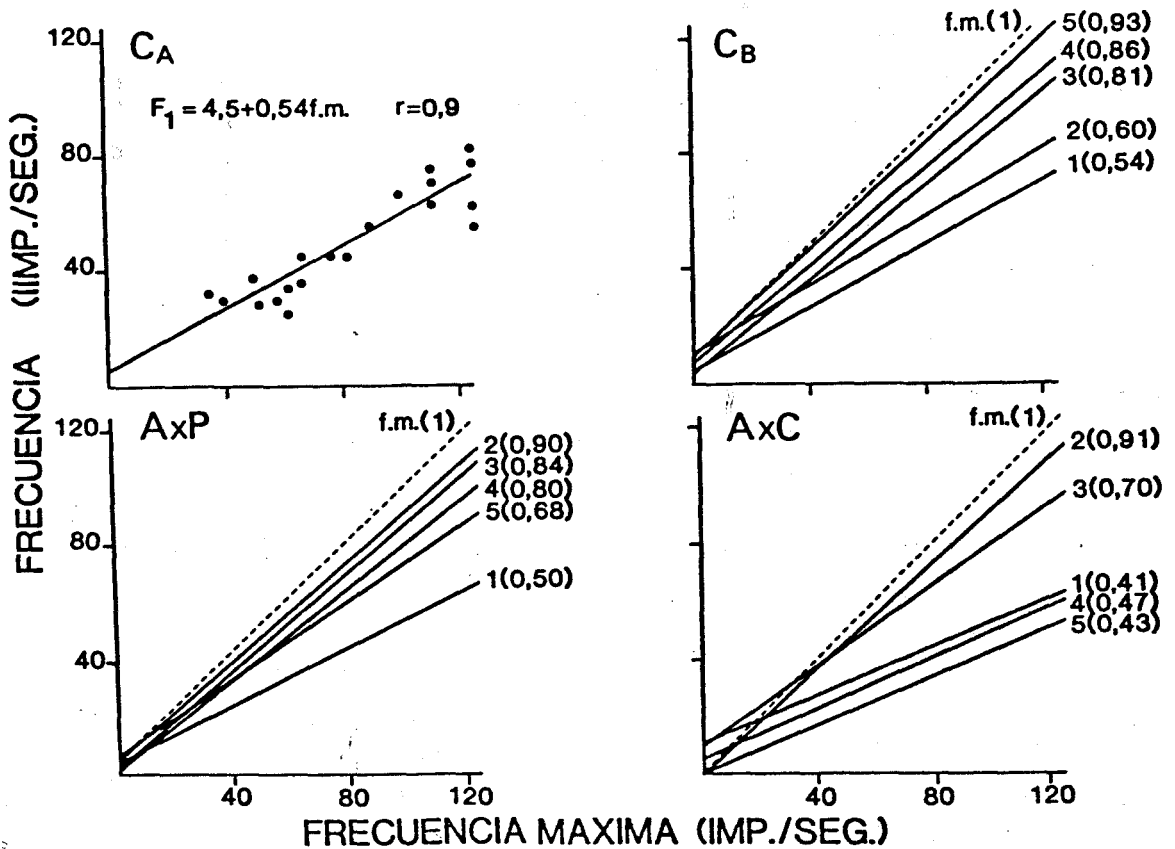


Figura 42.- Relaciones lineales entre la frecuencia instantánea (de los cinco primeros intervalos interespigas) y la frecuencia máxima (f.m.) alcanzada por motoneuronas controles (C) y axotomizadas (Ax) durante movimientos sacádicos. CA: representación de los valores observados en la relación del primer intervalo frente a f.m. en 20 movimientos diferentes. F1 indica la ecuación de la recta esperada, extraída de los valores observados para una motoneurona control. r, indica el valor del coeficiente de correlación obtenido en la determinación de la recta. CB: representación de las rectas esperadas para una motoneurona control, establecidas entre los cinco primeros intervalos (1,2,3,4,5) y f.m. Los valores entre paréntesis indican las pendientes de cada una de las rectas. AxP/C: representaciones similares a las realizadas para las motoneuronas controles en las sometidas a axotomía periférica (P) y central (C), respectivamente. Nótese como el valor de las pendientes aumenta progresivamente hasta el quinto intervalo en las controles y disminuye desde el segundo en las axotomizadas.

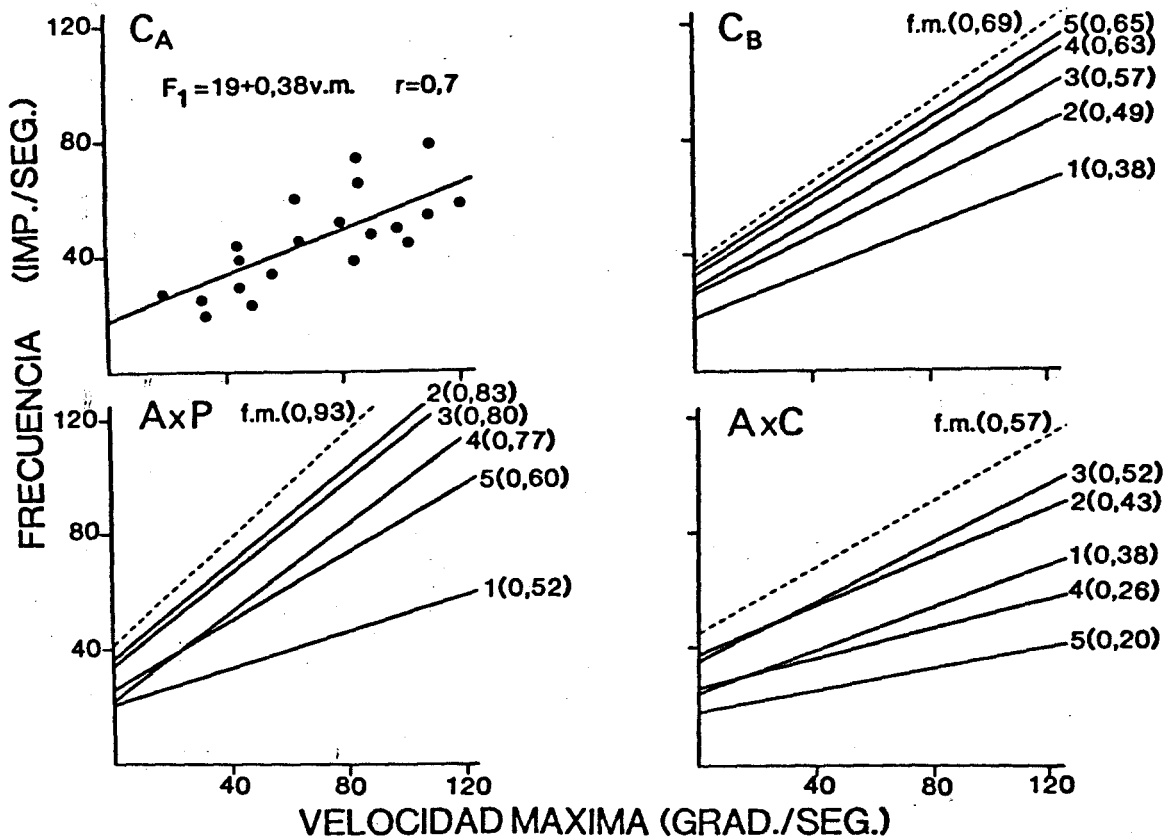


Figura 43.- Relaciones lineales entre la frecuencia instantánea (de los cinco primeros intervalos) de motoneuronas controles (C) y axotomizadas (Ax) y la velocidad máxima (v.m.) que se alcanza durante el movimiento sacádico. CA: representación de los valores observados en la relación del primer intervalo frente a v.m. en 20 movimientos diferentes. F1 indica la ecuación de la recta esperada, extraída de los valores observados, para una motoneurona control. r, indica el valor del coeficiente de correlación obtenido en la determinación de la recta. CB: representación de las rectas esperadas para una motoneurona control, establecida entre los cinco primeros intervalos (1,2,3,4,5) y la frecuencia máxima (f.m.) y v.m. Los valores entre paréntesis indican las pendientes de cada una de las rectas. AxP/C: representaciones similares a las realizadas para las controles en las motoneuronas sometidas a axotomía periférica y central (C), respectivamente. Nótese como el valor de las pendientes aumenta progresivamente en las controles hasta el quinto intervalo, y disminuye desde el segundo en las axotomizadas. Igual sucede con el valor de los umbrales.

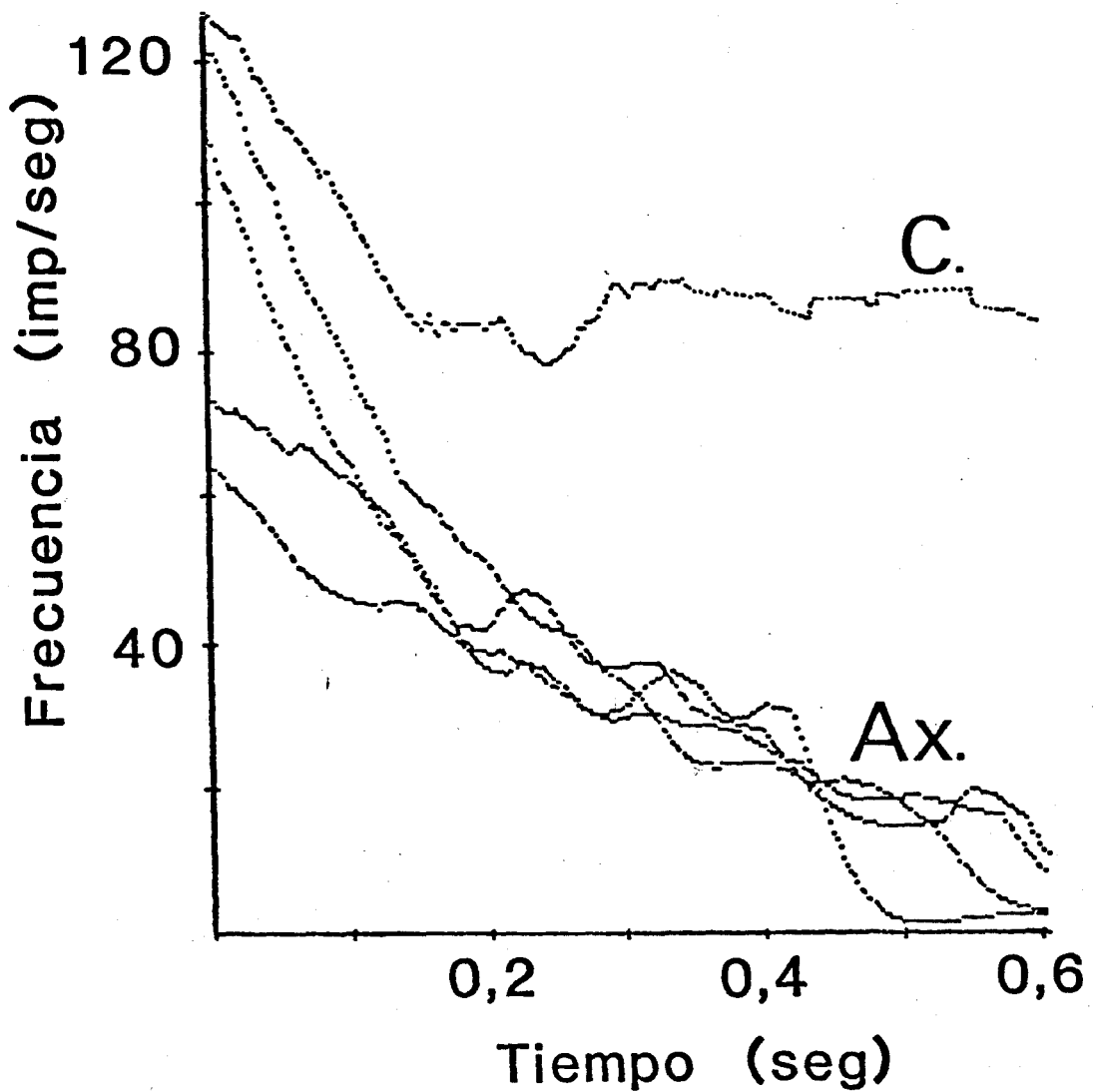
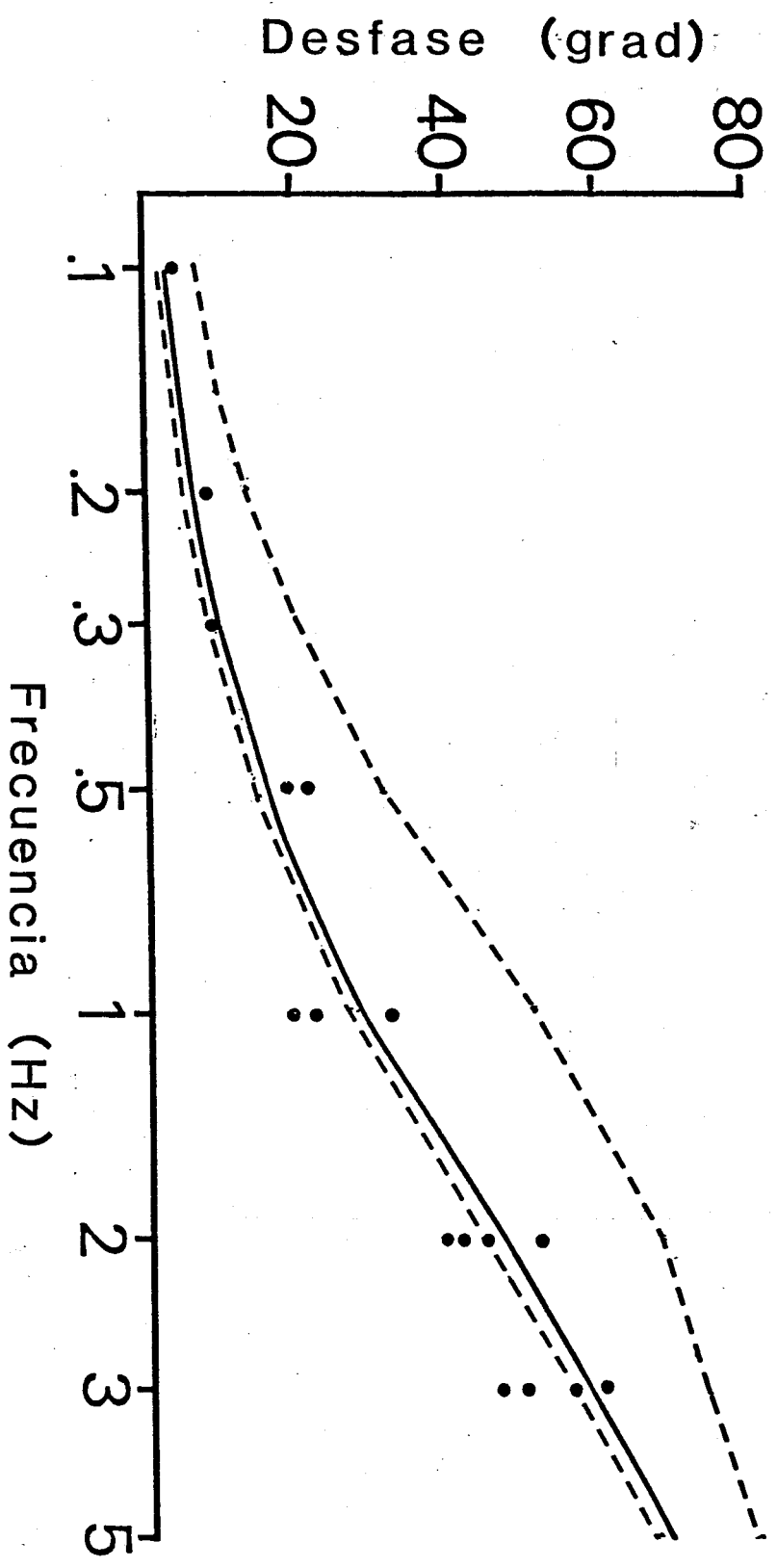


Figura 44.- Gráfica mostrando la caída de la frecuencia de disparo de las motoneuronas axotomizadas del núcleo motor ocular externo durante 4 movimientos sacádicos diferentes. Compárese con la actividad de una motoneurona control (C) durante el mismo tipo de movimiento.

Figura 46.- Diagrama de Bode en el que se representa el desfase entre la envolvente de la frecuencia de disparo de una motoneurona axotomizada del núcleo motor ocular externo y la posición del ojo homolateral en el plano horizontal, medidos a frecuencias crecientes de estimulación vestibular en el mismo plano. Se representan los valores reales medidos (puntos) y el ajuste a estos puntos empleando la ecuación definida por Skavenski y Robinson, 1973 (línea continua) (ver texto para más detalles). La línea de trazos muestra el rango de desfases obtenidos, para el mismo tipo de representaciones, en las motoneuronas controles.



5 DISCUSSION

5.1 VARIANTES APLICADAS A LA TECNICA DE LA PEROXIDASA DE RABANO

El aumento en la concentración de nitroferricianuro sódico ha sido descrito como uno de los factores que promueven la formación de productos inespecíficos en la reacción catalizada por la peroxidasa de rábano (Mesulam, 1982). Para determinar la concentración óptima de nitroferricianuro sódico en el medio de incubación se probaron cantidades crecientes de este producto, entre 10 y 300 mg por cada 300 ml de solución. Reduciendo la concentración de nitroferricianuro sódico, entre 10 y 30 mg por cada 300 ml, disminuyó ligeramente el producto inespecífico de reacción a la vez que disminuyó el número de motoneuronas marcadas. Este efecto se justifica por la propia acción del nitroferricianuro sódico como agente estabilizador de los derivados oxidados de la benzidina (Straus, 1964). Se ha comprobado que el color azul oscuro que adquiere la tetrametilbenzidina al ser oxidada se desvanece rápidamente si no se añade nitroferricianuro sódico al medio de incubación. Alrededor de 300 mg de nitroferricianuro sódico por cada 300 ml de medio de incubación fue una concentración adecuada para facilitar la estabilidad del producto de reacción sin producir excesivos precipitados inespecíficos. Este resultado coincide con

los descritos por otros autores (Mesulam y Rosene, 1979; Mesulam, 1982).

La reacción catalizada por la glucosa oxidasa consiste en la reducción de la glucosa y en la producción continuada, mientras existe sustrato, de peróxido de hidrógeno. La producción continuada de peróxido de hidrógeno acoplada a la actividad de la peroxidasa de rábano incrementa en 10 veces la producción de moléculas de cromógeno oxidadas por cada unidad de enzima (Lundquist y Josefsson, 1971). Esta variante en el revelado de la actividad de la peroxidasa de rábano, se ha propuesto como una forma alternativa de incorporación de peróxido de hidrógeno al medio de incubación (Itoh y col., 1979; Pásaro y col., 1983). Añadiendo altas concentraciones de peróxido de hidrógeno al medio de incubación (Mesulam, 1982) se provoca gran deterioro en la actividad de la peroxidasa de rábano, así como la aparición de productos inespecíficos de reacción en el tejido estudiado. Por otro lado, la variante glucosa oxidasa, según los presentes resultados, tuvo la ventaja de no afectarse por las condiciones ambientales.

La adición de cloruro de cobalto (Adams, 1977) al medio de incubación, para el revelado de la actividad de la peroxidasa de rábano con diaminobenzidina como cromógeno, incrementa la visibilidad del producto de la reacción. Esta técnica ha sido combinada con la variante de la glucosa

oxidasa para mejorar la eficacia de reacción (Itoh y col., 1979). Aunque los presentes resultados también indican que el producto de reacción se oscurece con el cloruro de cobalto, esta sustancia presenta como inconveniente el que produce una tinción indiscriminada de las neuronas del tejido.

Como cromógeno, la tetrametilbenzidina resultó más sensible para la actividad de la peroxidasa de rábano que la diaminobenzidina, de tal modo que el polímero de cromógeno por molécula de enzima fue más evidente bajo microscopía óptica (Mesulam y Rosene, 1979; Mesulam, 1982). Para Mesulam y Rosene (1979) el inconveniente fundamental que presenta el usar otras moléculas de cromógeno distintas a la tetrametilbenzidina es la disminución del número de neuronas marcadas retrógradamente. En los presentes experimentos no se observó tal efecto, aunque las neuronas marcadas retrógradamente con diaminobenzidina lo fueron más débilmente que las marcadas con tetrametilbenzidina.

5.2 EFECTOS DE LA AXOTOMIA SOBRE LA MORFOLOGIA DE LAS MOTONEURONAS DEL NUCLEO MOTOR OCULAR EXTERNO

Como consecuencia de la axotomía se produce, generalmente, la muerte de algunas de las células lesionadas (Smolen y Truex, 1977; Kawamura y Dyck, 1981; Richardson y col., 1982; Barron, 1983). Sin embargo, la incidencia que tiene la muerte de motoneuronas en el tronco del encéfalo, ha sido poco estudiada (Smolen y Truex, 1977; Baker y col., 1985; Pásaro y col., 1985). Los primeros resultados obtenidos, tras la axotomía del VI par craneal, aparecieron contradictorios; así, en el mono adulto se encontró una gran pérdida de motoneuronas en la población de motoneuronas del núcleo motor ocular externo (Carpenter y col., 1963), mientras que en el gato adulto dicha población no se afectó (Baker y col., 1981). Actualmente se ha descrito tanto para gatos jóvenes (Pásaro y col., 1985) como para adultos (Baker y col., 1985) que el número de motoneuronas del núcleo motor ocular externo que son capaces de reinervar el músculo recto externo está, como máximo, alrededor del 50%. Estas observaciones están plenamente de acuerdo con los resultados expuestos en este trabajo. Smolen y Truex (1977) han demostrado efectos similares, en el núcleo dorsal del vago, después de una vagotomía a nivel

cervical. Para el presente nivel experimental no existe ninguna razón que explique la pérdida del 50% de las motoneuronas del núcleo motor ocular externo, ya que dichas motoneuronas constituyen una población muy homogénea tanto morfológica (Steiger y Buttner-Ennever, 1977; Highstein y col., 1982) como funcionalmente (Delgado-García y col., 1985 c) y la lesión fue similar para todo el núcleo (Lisney, 1983 a y b). Indudablemente, otras aproximaciones experimentales de tipo bioquímico podrán ofrecer explicaciones más plausibles a dicho fenómeno.

Sorprendentemente, las motoneuronas del núcleo motor ocular externo que reinervaron al músculo recto externo no mostraron diferencias en tamaño, forma u organización dendrítica con respecto a las encontradas en las controles (Steiger y Buttner-Ennever, 1978; Delgado-García y col., 1978; Baker y col., 1981; Highstein y col., 1982). Estos resultados evidencian que los cambios detectados a nivel electrofisiológico y funcional (Baker y col., 1981; Ribas y col., 1982; Serra y col., 1982; Delgado-García y col., 1985 b; Torres y col., 1985 a y b) no pueden ser explicados por alteraciones a nivel de microscopía óptica en la población de motoneuronas (Delgado-García y col., 1978; Baker y col., 1981, 1985).

Un aspecto, aún no cuantificado, pero observado para diferentes grupos neuronales axotomizados, ha sido la

dificultad de las motoneuronas lesionadas para el transporte retrógrado de moléculas de elevado peso molecular (Aldskogius y col., 1983; Redshaw y Bisby, 1985). En el caso de las motoneuronas del núcleo motor ocular externo estas deficiencias del sistema de transporte se han puesto de manifiesto por el escaso marcaje con peroxidasa de rábano de las dendritas principales.

Golberg y col. (1981) han sugerido una organización somatotópica de la población de motoneuronas del núcleo motor ocular externo, de tal modo que las motoneuronas que inervan las fibras musculares de contracción lenta se localizan más ventralmente en el núcleo con respecto a aquellas que inervan a las fibras de contracción más rápida. Por otro lado, tras la denervación de los músculos oculares se ha observado la degeneración preferencial de las fibras rojas (Baker y col., 1982). Juntando ambos factores se podría esperar que la muerte de motoneuronas sería más importante para determinadas áreas del núcleo. De acuerdo con los resultados expuestos, la pérdida de motoneuronas axotomizadas parece tener lugar de forma aleatoria en el núcleo, ya que la distribución espacial de las motoneuronas, tras la lesión, fue similar a la mostrada en los controles.

5.3 IDENTIFICACION ANTIDROMICA DE LAS MOTONEURONAS AXOTOMIZADAS DEL NUCLEO MOTOR OCULAR EXTERNO

Como consecuencia de la axotomía las motoneuronas del núcleo motor ocular externo sufrieron un aumento en la latencia de activación antidrómica del soma neuronal. Este fenómeno indica la disminución de la velocidad de conducción para dichas motoneuronas. La disminución de la velocidad de conducción ha sido ampliamente observada en las motoneuronas espinales (Kuno y col., 1974; Mendell y col., 1976; Blight, 1983). Los cambios encontrados se atribuyeron, inicialmente, a una reducción en el diámetro de la fibra (Cragg y Thomas, 1961), así como a una disminución en la distancia entre nodos de Ranvier (Cragg y Thomas, 1964). Recientemente se ha encontrado que otros factores pueden también explicar la disminución de la velocidad de conducción; por ejemplo, las variaciones en la resistencia de la membrana axonal debido a los cambios en el espesor de la capa de mielina durante el proceso de regeneración (Smith y Hall, 1980). Para las motoneuronas axotomizadas del núcleo motor ocular externo se ha descrito un importante retraso en la invasión antidrómica del segmento inicial, debido a los cambios en el flujo de corriente a través de este compartimiento neuronal (Baker y col., 1981; Serra y col., 1982). Probablemente, el aumento

de la latencia de activación antidrómica del soma neuronal se debe a la acción combinada de la disminución de la velocidad de conducción más el retraso en la invasión antidrómica del segmento inicial.

5.4 ACTIVIDAD DE LAS MOTONEURONAS AXOTOMIZADAS DEL NUCLEO MOTOR OCULAR EXTERNO DURANTE MOVIMIENTOS OCULARES ESPONTANEOS

En las motoneuronas espinales de animales anestesiados la axotomía produce diversas modificaciones electrofisiológicas que se han explicado por dos tipos de cambios: a) En las características eléctricas de la membrana plasmática; y b) En las entradas sinápticas. Probablemente la acción conjunta de ambas clases de modificaciones justifican, también, las anomalías descritas en el comportamiento de las motoneuronas axotomizadas del núcleo motor ocular externo. A continuación se discuten los resultados expuestos en este trabajo en base a estas hipótesis.

El registro intracelular de motoneuronas axotomizadas del núcleo motor ocular externo ha demostrado que la lesión neuronal produce una disminución de la excitabilidad del segmento inicial (Baker y col., 1981). Dicho fenómeno se ha encontrado también en motoneuronas espinales (Eccles y col., 1958; Gustafsson, 1979) y explica a nivel neurofisiológico la dificultad de activación antidrómica de las motoneuronas axotomizadas en el animal despierto. Si a esto se añade el hecho de que no se ha observado en las motoneuronas del núcleo motor ocular

externo la presencia de potenciales dendríticos activos, descritos en las motoneuronas espinales (Baker y col., 1981; Kuno y Llinás, 1970 a; Heyer y Llinás, 1977) se puede entender entonces la pérdida de actividad tónica que presentan dichas motoneuronas tras su axotomía. Sólo la presencia de estímulos intensos de origen vestibular y visual son capaces de producir la activación, casi siempre momentánea, de dichas motoneuronas.

En motoneuronas espinales axotomizadas se ha descrito la retracción de botones sinápticos, así como los cambios funcionales que ocasiona esta alteración (Sumner, 1975; Kuno y Llinás, 1970 b; Heyer y Llinás, 1977; Takata y Nagahama, 1983). Naturalmente, la retirada de la entrada sináptica con señal de posición ocular explicaría, fácilmente, la dramática pérdida del componente tónico en la frecuencia de disparo en las motoneuronas del núcleo motor ocular externo. De ser cierta esta hipótesis, la respuesta a la axotomía de las motoneuronas oculares presenta tal grado de selectividad que no sólo discriminan entre entradas sinápticas cualitativamente distintas, activadoras o inhibitoras, sino, incluso, dentro de las primeras, entre las señales de tipo tónico o fásico (ya que las segundas entran con sutiles diferencias respecto de las observadas en los controles). En este fenómeno puede jugar un papel importante la localización en soma y/o dendritas de los botones sinápticos correspondientes, aunque hasta el momento

no se puede establecer ninguna correlación morfofuncional con base experimental (Spencer y Sterling, 1977; Delgado-García y col., 1978; Baker y col., 1981; Ribas y col., 1982; Torres y col., 1985 a y b).

Se ha descrito que con la reinervación apropiada de las células blanco las motoneuronas lesionadas recuperan sus características morfológicas y electrofisiológicas (Purves, 1975; Sumner, 1976; Gallego y col., 1979). El potencial de campo de las motoneuronas axotomizadas del núcleo motor ocular externo se recupera rápidamente, 30 días o menos, tras la lesión (Baker y col., 1981; Serra y col., 1982). Sin embargo, la actividad unitaria en dichas motoneuronas continúa mostrando importantes deficiencias en este periodo, y aún un año después de ocasionada la lesión la recuperación funcional no es completa. Estas observaciones indican que no todos los cambios fisiológicos que tienen lugar en las neuronas axotomizadas, siguen el mismo patrón de recuperación. Conclusiones similares se han obtenido en otros sistemas comparando variables como la velocidad de conducción y la duración de la hiperpolarización que sigue a un potencial de acción (Morales y col., 1985).

Una de las modificaciones más sorprendentes en la conducta de las motoneuronas axotomizadas del núcleo motor ocular externo fue la aparición de cortos brotes de

actividad que precedieron o acontecieron durante los movimientos sacádicos en la dirección de inactivación. La explicación a este fenómeno puede venir dada por la retracción de botones sinápticos, preferentemente inhibidores, en la membrana somática o dendritas proximales de dichas motoneuronas (Sumner, 1975; Delgado-García y col., 1978; Baker y col., 1981; Ribas y col., 1982). Hasta el momento se ha descrito en las motoneuronas de este núcleo la pérdida de los postpotenciales sinápticos inhibidores de origen vestibular (Baker y col., 1981), siendo aún hipotética la retirada de la entrada inhibidora de origen reticular. La retirada preferente de botones inhibidores puede producir desequilibrios tanto para los movimientos oculares puros en el plano vertical como para aquellos horizontales en la dirección de inactivación, ya que durante estos movimientos las motoneuronas del núcleo motor ocular externo reciben activación e inhibición simultánea y equivalente de las neuronas reticulares de brote excitadoras e inhibidoras, los dos grupos neuronales encargados de la génesis de los movimientos sacádicos (Robinson, 1981; Van Gisbergen y col., 1981).

La fatigabilidad de la frecuencia de disparo o la ausencia de ésta en las motoneuronas axotomizadas del núcleo motor ocular externo durante fijaciones oculares, se tradujo a nivel poblacional en un fuerte descenso, aproximadamente un 25%, en la sensibilidad a la posición

ocular (constante neuronal k en el sistema motor ocular, Robinson, 1970) y en un desplazamiento del umbral, $2,1^\circ$ hacia la izquierda, de activación para dichas motoneuronas (Delgado-García y col., 1985 b y c). Ambas modificaciones parecen ser un fiel reflejo de la disminución de la excitabilidad neuronal descrita en experimentos agudos para estas motoneuronas (Baker y col., 1981).

Es importante resaltar la diferencia en los cambios de su excitabilidad de las motoneuronas espinales y troncoencefálicas tras su axotomía. Inicialmente se comprobó, para las primeras, una fuerte disminución en la amplitud y duración de los postpotenciales sinápticos activadores (Kuno y Llinás, 1970 b; Kuno y col., 1974; Purves, 1975), lo que inevitablemente conduce a una disminución de la actividad general de la neurona lesionada. Sin embargo la variación en otros parámetros tales como la amplitud y duración de la hiperpolarización que sigue a un potencial de acción, la resistencia de membrana, la capacitancia, la constante de tiempo neuronal, la aparición de potenciales de acción dendríticos (Kuno y Llinás, 1970 a; Kuno y col., 1974; Gustafsson, 1979; Gustafsson y Pinter, 1984) hacen que las motoneuronas espinales respondan con aumentos de frecuencias mucho mayores a los controles en respuesta a la inyección de corriente, sobre todo cuando ésta tiene baja intensidad (Heyer y Llinás, 1977; Gustafsson, 1979). La conducta de las motoneuronas del

núcleo motor ocular externo tanto en experimentos agudos (Delgado-García y col., 1978; Baker y col., 1981; Serra y col., 1982) como en experimentos crónicos (Torres y col., 1985 a y b) reflejan, contrariamente a lo observado en las motoneuronas espinales axotomizadas, una disminución general de la excitabilidad neuronal, ya que la respuesta a entradas sinápticas excitadoras es una frecuencia de disparo anormalmente baja.

Durante movimientos oculares sacádicos las motoneuronas del núcleo motor ocular externo reciben dos entradas sinápticas, desde la formación reticular del puente, proporcionales a posición y a velocidad ocular (Robinson, 1970; Kaneko y col., 1981; Van Gisbergen y col., 1981). Tras la axotomía, la actividad característica para las motoneuronas controles, de acuerdo con los presentes resultados, se mostró claramente alterada. La sensibilidad a la velocidad ocular (constante neuronal r en el sistema motor ocular. Robinson, 1970) fue menor. Este resultado se puede explicar por la escasa importancia en la entrada del componente de posición, ya que éste sólo se encontró con valores apreciables para movimientos que llevaron al ojo a posiciones muy extremas, así como por la disminución y acortamiento del componente de velocidad de la frecuencia. Este resultado puede estar en relación con la disminución de los postpotenciales sinápticos excitadores observados en las motoneuronas espinales axotomizadas (Kuno y col., 1970

b; Kuno y col., 1974; Purves, 1975).

Recientemente se ha mostrado que para generar movimientos oculares sacádicos las motoneuronas del núcleo motor ocular externo producen un aumento de frecuencia graduado, de tal manera que la actividad máxima que se desarrolla en cada movimiento está implícita desde el primer intervalo de frecuencia (Gómez y col., 1984; Torres y col., 1985 a y b). Las motoneuronas axotomizadas del mismo núcleo responden de forma similar, si bien su frecuencia máxima se alcanza antes, alrededor del segundo o tercer intervalo interespiga frente al quinto o sexto de las controles.

El total de corrientes sinápticas presentes en un momento dado en la membrana de una motoneurona se traduce en la frecuencia instantánea de producción de potenciales de acción y, finalmente, en la contracción de las fibras musculares que la motoneurona inerva (Baldissera y Campadelli, 1977). Se ha demostrado que la respuesta neuronal a pulsos transitorios de corriente depende de la intensidad y velocidad con la que éstos se aplican (Baldissera y col., 1982). En el gato despierto, la evolución de la frecuencia instantánea de disparo de las motoneuronas controles del núcleo motor ocular externo presenta características similares a las descritas in vitro (Baldissera y col., 1982; Gómez y col., 1984). La frecuencia máxima se obtuvo siempre en el cuarto o quinto

intervalo; sin embargo, el tiempo invertido en conseguirla varió según los valores que tomó este parámetro. Las diferencias en el tiempo necesario para llegar a la frecuencia máxima se pueden explicar por un efecto transitorio de corriente, de tal modo que el incremento de entradas sinápticas activadoras provocaría no sólo el aumento de la frecuencia máxima sino también el acortamiento del tiempo invertido en alcanzarla. El hecho de que la relaciones lineales se mantuviesen entre la frecuencia instantánea de los primeros intervalos y la frecuencia máxima o la velocidad máxima tanto para las motoneuronas controles como para las axotomizadas se puede deber a que la cinética, aproximadamente exponencial (Jimenez-Ridruejo y col., 1984), de entradas de postpotenciales excitadores no se modificase por la axotomía. Esto implica que la axotomía puede provocar la retirada de botones sinápticos pero no altera, básicamente, el mecanismo de despolarización graduada que realizan las neuronas premotoras sobre las motoneuronas del núcleo motor ocular externo. Estos resultados sugieren, también, que no se producen modificaciones funcionales en las neuronas premotoras tras las axotomía de las neuronas blanco.

5.5 ACTIVIDAD DE LAS MOTONEURONAS AXOTOMIZADAS DEL NUCLEO MOTOR OCULAR EXTERNO DURANTE MOVIMIENTOS OCULARES INDUCIDOS VESTIBULARMENTE

Durante el reflejo vestibulo-ocular los ojos se desplazan conjuntamente con el movimiento de la cabeza, pero con sentido contrario, con el fin de mantener la mirada en un blanco establecido (Skavenky y Robinson, 1973; Precht, 1979; Leigh y Zee, 1983). La actividad de las motoneuronas del núcleo motor ocular externo durante este reflejo es de características parecidas a las que existen durante estimulación de origen visual, es decir su frecuencia de disparo se define por una ecuación diferencial de primer orden con un término de la ecuación proporcional a posición ocular y otro proporcional a velocidad ocular (Skavenski y Robinson, 1973). Sin embargo, la vía neural premotora es diferente a la que existe para la generación de los movimientos sacádicos (Precht, 1979; Godaux y Laune, 1983), aunque la señal que suministren a las motoneuronas sea parecida (Serra, 1982). Para altas frecuencias de estimulación, 5 Hz o más, la actividad en las motoneuronas controles se encuentra desplazada $< 90^\circ$ adelantada con respecto a la posición ocular, por lo que se puede asumir que dichas motoneuronas portan, fundamentalmente, señal de velocidad. Para bajas frecuencias, 0,1-1 Hz, la frecuencia

de disparo se encuentra en fase con la posición ocular, por lo que se asume que dichas motoneuronas portan, fundamentalmente, señal de posición (Skavenski y Robinson, 1973; Gómez y Delgado-García, 1984). El hecho de que las motoneuronas axotomizadas del núcleo motor ocular externo presentaran un desfase entre la envolvente de su frecuencia y la posición ocular similar al observado para las controles indica que la axotomía no provocó la retirada, preferencial, de aferencias sinápticas activadoras y/o inhibitoras con información de posición o velocidad ocular de origen vestibular.

De acuerdo con los presentes resultados, las motoneuronas axotomizadas del núcleo motor ocular externo mostraron valores inferiores de frecuencia máxima, así como menor número de espigas que las controles para un mismo rango de estimulación vestibular. Este resultado puede ser debido tanto a la pérdida, en cantidad parecida, de entradas sinápticas con señal de posición y velocidad ocular, o bien ser la consecuencia de una elevación del umbral de actividad en dichas motoneuronas (Baker y col., 1981; Serra y col., 1982).

5.6 CONSIDERACIONES FINALES

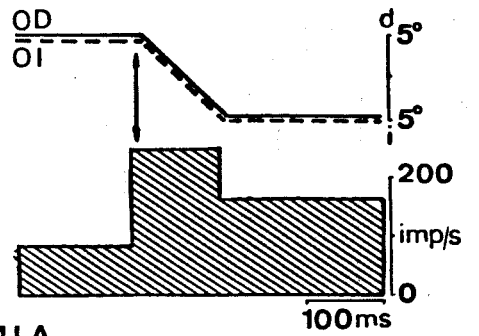
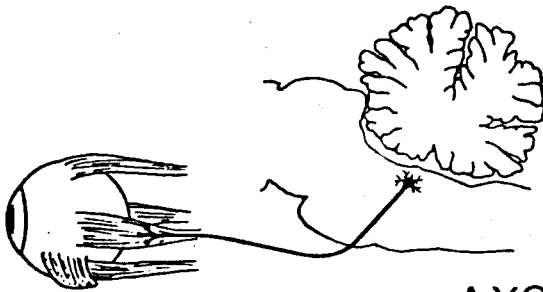
La actividad en las motoneuronas controles del núcleo motor ocular externo del gato despierto muestra un componente tónico relacionado con la posición ocular y otro fásico relacionado con la velocidad del movimiento ocular. La axotomía produce drásticas alteraciones en la actividad de las motoneuronas lesionadas tanto en el componente tónico como en el fásico (figura 47). Estas alteraciones aparecen más marcadas entre 30 y 90 días después de la lesión, así como cuando ésta se practica centralmente. En base a la discusión realizada (ver apartado 5.4) la hipótesis que mejor explica estos resultados consiste en una disminución de la excitabilidad neuronal, debido a la subida del umbral, como se ha sugerido en experimentos agudos (Baker y col., 1981; Serra y col., 1982). A esta disminución de la excitabilidad se une, probablemente, la disminución en la eficacia sináptica, descrita a niveles morfológicos y electrofisiológicos (Kuno y Llinás, 1970 a y b; Sumner, 1975), y refrendada en este trabajo a niveles fisiológicos (ver apartado 5.4)

Otro aspecto interesante es la recuperación funcional en las motoneuronas axotomizadas del núcleo motor

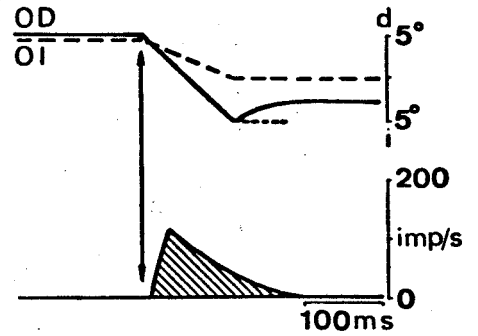
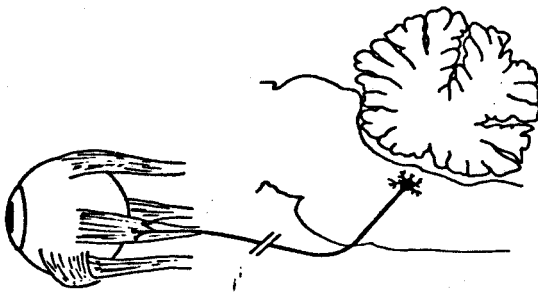
ocular externo del gato despierto, así como la reaparición de la motilidad en el ojo afectado por la lesión (figura 47). Estos hallazgos confirman los resultados obtenidos a otros niveles experimentales (Purves, 1975; Sumner, 1976; Gallego y col., 1979; Morales y col., 1985), y constituyen una importante aportación al conocimiento de la fisiopatología de la respuesta neuronal a la lesión.

Figura 47.- Diagrama en el que se resumen las alteraciones más sobresalientes en la actividad de las motoneuronas axotomizadas del núcleo motor ocular externo desde la lesión hasta un año después de producida ésta. La actividad en las motoneuronas controles durante movimientos del ojo derecho (OD) e izquierdo (OI) hacia la izquierda (i) se muestra de tipo tónico-fásico. Después de la lesión (60 días) las motoneuronas pierden el componente tónico y muestran importantes alteraciones en el componente fásico (véase el retraso en el inicio de la actividad, flechas en la figura). Posteriormente se recuperan paulatinamente los patrones de actividad típicos de las motoneuronas controles, a la vez que reaparece la motilidad ocular en el ojo afectado. (Para más detalles ver el texto).

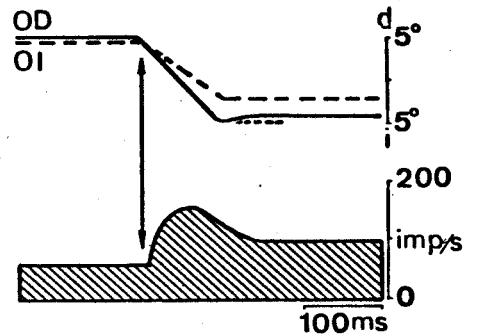
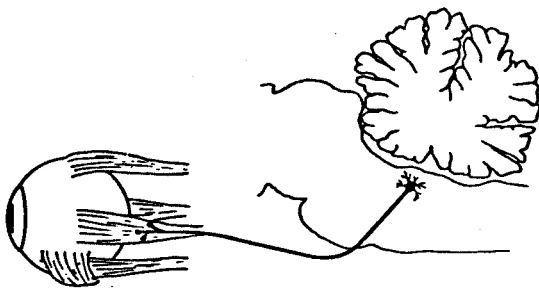
CONTROL



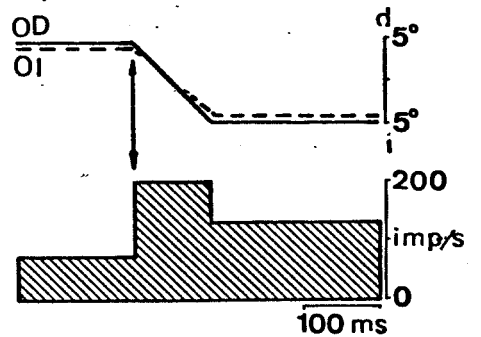
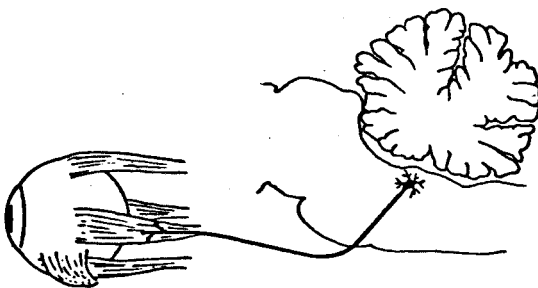
AXOTOMIA 60 días



120 días



360 días



6 CONCLUSIONES

Como consecuencia de los resultados expuestos y de la discusión de los mismos se pueden obtener las siguientes conclusiones:

1.- Dos meses después de la axotomía del VI par craneal, el número de motoneuronas del núcleo motor ocular externo marcadas retrógradamente, tras la inyección de la enzima de la peroxidasa de rábano en el músculo recto externo, fue inferior en un 50% al encontrado en las poblaciones controles.

2.- La pérdida de motoneuronas del núcleo motor ocular externo como consecuencia de la lesión siguió un patrón aleatorio dentro de dicho núcleo. No se observó ninguna orientación preferente, dorso-ventral o rostro-caudal, para la desaparición de neuronas marcadas retrógradamente con el producto de reacción de la peroxidasa de rábano. Tampoco se observó que la pérdida de motoneuronas fuese superior para alguno de los diferentes tipos morfológicos presentes en el núcleo.

3.- La axotomía del VI par craneal no produjo cambios apreciables en las características morfométricas de la población de motoneuronas del núcleo motor ocular externo. Las motoneuronas lesionadas mostraron un diámetro medio de $24 \pm 1,89 \mu\text{m}$ frente a los $23,1 \pm 1,86 \mu\text{m}$ obtenidos para la población control.

4.- Inmediatamente después de la axotomía del VI par craneal izquierdo, el ojo lesionado fue incapaz de realizar movimientos y/o fijaciones tendentes a superar el centro de la órbita ocular hacia la izquierda, es decir, la dirección de acción activa del músculo denervado. Conforme se reinervó el músculo recto externo, el ojo pudo realizar desplazamientos hacia la izquierda progresivamente más amplios. No obstante un año después de la axotomía el ojo lesionado fue incapaz de abarcar todo el rango oculomotor.

5.- Acompañando a la incapacidad del ojo lesionado para superar el centro de la órbita en el plano horizontal se observó, en el ojo no afectado, una vez que éste sobrepasó el centro de la órbita, un lento proceso de deslizamiento hacia posiciones más centrales. Este fenómeno parece estar encaminado a corregir las situaciones de visión doble.

6.- Las espigas somáticas inducidas por la activación antidrómica de las motoneuronas axotomizadas del núcleo motor ocular externo mostraron un claro retraso en la invasión del segmento inicial y del espacio somato-dendrítico con respecto a las controles. Este resultado indica la aparición de importantes cambios en las propiedades de membrana de ambos compartimientos neuronales.

7.- Después de la axotomía del VI par craneal las

motoneuronas del núcleo motor ocular externo mostraron un fuerte incremento de la latencia de activación antidrómica, lo cual equivale a una disminución de la velocidad de conducción. Este cambio fue más importante para la axotomía central que periférica.

8.- Las motoneuronas axotomizadas del núcleo motor ocular externo mostraron una actividad diferente a las controles durante fijaciones y movimientos oculares. La frecuencia tónica de disparo, presente durante fijaciones oculares, se perdió progresivamente hasta desaparecer en, prácticamente, todo el rango oculomotor. La actividad fásica, presente durante movimientos sacádicos, mostró como alteración más evidente el retraso en su aparición, ya que comenzó aproximadamente 38 mseg después de iniciado el movimiento. Otro rasgo característico en la actividad de las motoneuronas axotomizadas fue la aparición de brotes de corta duración antes o durante movimientos sacádicos en la dirección de inactivación. Las anomalías anteriormente mencionadas se hicieron más notables entre 30 y 90 días después de la lesión y cuando ésta se practicó centralmente. Un año después de la axotomía se recuperó, en gran medida, la actividad normal en la población de motoneuronas axotomizadas.

9.- La sensibilidad de las motoneuronas axotomizadas del núcleo motor ocular externo a la posición

ocular, constante k (impulsos/seg/grado), fue aproximadamente un 25% menor que en las controles. Por otro lado, el umbral, posición ocular a partir de la cual se reclutan las motoneuronas oculomotoras, se desplazó hacia la izquierda en $2,1^\circ$ cuando la población neuronal se sometió a la axotomía.

10.- La sensibilidad de las motoneuronas axotomizadas del núcleo motor ocular externo a la velocidad, constante r (impulsos/seg/grado/seg), fue ligeramente inferior con respecto a las controles.

11.- Separando en sus componentes de posición y velocidad la actividad de motoneuronas axotomizadas del núcleo motor ocular externo se observó que el primero (posición) estuvo escasamente representado durante dichos movimientos, mientras que el segundo (velocidad) mostró valores inferiores en frecuencia máxima y duración con respecto a las motoneuronas controles.

12.- Durante movimientos sacádicos tanto la población de motoneuronas controles como axotomizadas mostraron una subida graduada en su frecuencia, de tal modo que la frecuencia máxima obtenida para cada movimiento se determinó desde el primer intervalo interespiga. No obstante, las motoneuronas axotomizadas evidenciaron un agotamiento prematuro en la cinética del brote de actividad,

ya que su frecuencia máxima se alcanzó durante el segundo o tercer intervalo, mientras que en las controles dicha frecuencia máxima no se obtuvo hasta el quinto o sexto intervalo.

13.- Las caídas de actividad, presentes en las motoneuronas axotomizadas del núcleo motor ocular externo, durante fijaciones oculares mostraron una cinética casi exponencial. La evolución de estas exponenciales indica que la pérdida de la frecuencia de disparo está, probablemente, relacionada con la rápida disminución de la corriente activadora suministrada a la motoneurona durante movimientos sacádicos.

14.- Las motoneuronas axotomizadas del núcleo motor ocular respondieron a la estimulación de origen vestibular, con un aumento progresivo del desfase entre la posición ocular y la actividad en dichas motoneuronas para las frecuencias de estimulación más altas. Este comportamiento fue similar al observado en la población de motoneuronas controles.

7 BIBLIOGRAFIA

ADAMS, J.C. (1977): Technical considerations on the use of horseradish peroxidase as a neuronal marker. *Neuroscience*, 2: 141-145.

ALBERGHINA, M., VIOLA, M. y GIUFFRIDA, A.M. (1984): Myelination process in the rat sciatic nerve during regeneration and development: molecular species composition and acyl group biosynthesis of choline-, ethanolamine-, serine-glycerophospholipids of myelin fractions. *Neurochem. Res.*, 9: 887-901.

ALDSKOBIUS, H., ARVIDSSON, J. y KINNMAN, E. (1983): Movement of horseradish peroxidase after its entry into intact and damaged peripheral nerve axons. *Exp. Neurol.*, 79: 862-866.

ALLT, G. (1976): Pathology of the peripheral nerve. En "The peripheral nerve", D.N. Landon (ed.), Chapman and Hall, Londres, págs. 666-739.

BAKER, R., DELGADO-GARCIA, J.M y McCREA, R. (1981): Morphological and physiological effects of axotomy on cat abducens motoneurons. En "Lesion-Induced neuronal plasticity in sensorimotor systems", H. Flohr y W. Precht (eds.), Springer-Verlag, Berlín, págs. 51-63.

BAKER, R. e HIGHSTEIN, S.M. (1975): Physiological identification of interneurons and motoneurons in the

abducens nucleus. Brain Res., 83: 292-298.

BAKER, R., MANO, N. y SHIMAZU, H. (1969): Intracellular recording of antidromic response from abducens motoneurons in the cat. Brain Res., 15: 573-576.

BAKER, R., PECK, C., SPENCER, R.F., DELGADO-GARCIA, J.M. y WINTERKORM, J. (1985): Structural and functional assessment of the reinnervation pattern of cat extraocular muscle following central cut of the IIIrd, IVth and Vth cranial nerves. Neurosci. Absts. (en prensa).

BAKER, R. y SPENCER, R.F. (1981): Synthesis of horizontal conjugate eye movement signals in the abducens nucleus. Jap. Soc. EEG & EMG Suppl., págs. 49-59.

BAKER, R.S., MILLET, A.J., BYRONYOUNG, A. y MARKESBERY, W.R. (1982): Effects of chronic denervation on the histology of canine extraocular muscle. Invest. Ophthalmol. Vis. Sci., 22: 701-705.

BALDISSERA, F. y CAMPADELLI, P. (1977): How motoneurons control development of muscle tension. Nature, 268: 146-147.

BALDISSERA, F., CAMPADELLI, P. y PICCINELLI, L. (1982): Impulse coding of ramp currents intracellularly injected into pyramidal tract neurons. Exp. Brain Res., 48: 455-458.

BARRON, K.D. (1983): Axon reaction and central nervous system regeneration. En "Nerve, organ and tissue regeneration: research perspectives", F.J. Seil (ed.), Academic Press, Inc., Londres, págs. 3-36.

BARRON, K.D., DENTINGER, M.P. y RODICHOK, L.D. (1981): The axon reaction of central and peripheral mammalian neurons: a comparison. En "Posttraumatic peripheral nerve regeneration: experimental basis and clinical implications", A. Gorio (ed.), Raven Press, Nueva York, págs. 17-26.

BERMAN, A.L. (1968): The brain stem of the cat. A cytoarchitectonic atlas with stereotaxic coordinates. The University of Wisconsin Press, Madison.

BERNSTEIN, J.J., WACKER, W. y STANDLER, N. (1984): Spinal motoneuron dendritic alteration after spinal cord hemisection in the rat. *Exp. Neurol.*, 83: 548-554.

BERTRAND, F., MENINI, C. y TYC-DUMONT, S. (1966): Activités unitaires oculomotrices au cours du nistagmus. *J. Physiol.* (Paris), 58: 465-466.

BIRSE, S.C. Y BITTNER, G.D. (1976): Regeneration of giant axons in earthworms. *Brain Res.*, 113: 575-581.

BITTNER, G.D. y JOHNSON, A.L. (1974): Degeneration and regeneration in crustacean peripheral nerves. *J. Comp. Physiol.*, 89: 1-7.

BLIGHT, A.R. (1983): Axonal physiology of chronic spinal cord injury in the cat: intracellular recording in vitro. *Neuroscience*, 10: 1471-1486

BRINKMAN, C., PORTER, R. y NORMAN, J. (1983): Plasticity of motor behavior in monkeys with forelimb nerves. *Science*, 220: 438-440.

BROWN, M.C., HOLLAND, R.L. y HOPKINS, W.G. (1981): Motor nerve sprouting. *Ann. Rev. Neurosci.*, 4: 17-42.

BRUSHART, T.M. y MESULAM, M.M. (1980): Alteration in connections between muscle and anterior horn motoneurons after peripheral nerve repair. *Science*, 208: 603-605.

CAMPBELL, B. (1944): The effects of retrograde degeneration upon reflex activity of ventral horn neurones. *Anat. Record*, 88: 25-34.

CARPENTER, M.B., McMASTERS, R.E. y HANNA, G.R. (1963): Disturbances of conjugate horizontal eye movements in the monkey. I. Physiological effects and anatomical degeneration resulting from lesions of the abducens nucleus and nerve.

Arch. Neurol., 8: 231-247.

CARPENTER, R.H.S. (1977): Movements of the eyes. Pion Limited, 207 Brouderbury Park, Londres.

CATTERALL, W.A. (1984): The molecular basis of neuronal excitability. Science, 223: 653-661.

CHEN, D.H. (1978): Qualitative and quantitative study of synaptic displacement in chromatolysed spinal motoneurons of the cat. J. Comp. Neurol., 177: 635-664.

CHI, N.H. y DAHL, D. (1983): Autologous peripheral nerve grafting into murine brain as a model for studies of regeneration in the central nervous system. Exp. Neurol., 79: 245-264.

CLEMENTE, C.D. (1964): Regeneration in the vertebrate central nervous system. Int. Rev. Neurobiol., 6: 257-260.

COOMBS, J.S., CURTIS, D.R. y ECCLES, J.C. (1959): The electrical constants of the motoneurone membrane. J. Physiol. (Londres), 145: 505-528.

COTMAN, C.W. (1983): Reactive synaptogenesis in the adult CNS. En "Nerve, organ, and tissue regeneration: research perspectives", F.J. Seil (ed.), Academic Press, Inc.,

Londres, págs. 269- 282.

CRAGG, B.G. (1970): What is the signal for chromatolysis?.
Brain Res., 23: 1-21.

CRAGG, B.G. y THOMAS, P.K. (1961): Changes in conduction velocity and fiber size proximal to peripheral nerve lesions. J. Physiol (Londres), 157: 315-327.

CRAGG, B.G. y THOMAS, P.K. (1964): The conduction velocity of regenerated peripheral fibers. J. Physiol (Londres), 171: 164-176.

CRICK, F.H.C. (1980): Reflexiones en torno al cerebro. En "El cerebro", Libros Investigación y Ciencia, Labor S.A. (ed.), Barcelona.

CRUMLEY, R.L. y SAN FRANCISCO, C.A. (1983): Phrenic graft for bilateral vocal cord paralysis. Laryngoscope, 43: 425-428.

CZEK, G., GALLEGU, R., KUDO, N. y KUNO, M. (1978): Evidence for the maintenance of motoneurone properties by muscle activity. J. Physiol. (Londres), 281: 239-252.

DELGADO-GARCIA, J.M., BAKER, R., ALLEY, K. y McCREA, R. (1978): Anatomy and physiology of axotomized cat abducens

motoneurons. Neurosci. Absts., 4: 602.

DELGADO-GARCIA, J.M., BAKER, R. e HIGHSTEIN, S.M. (1977): The activity of internuclear neurons identified within the abducens nucleus of the alert cat. En "Control of gaze by brain stem neurons". R. Baker y A. Berthoz (eds.), Elsevier North Holland, Amsterdam, págs. 291-300.

DELGADO-GARCIA, J.M., BERTHOZ, A. y VIDAL, P.P. (1985 a): Eye movements related activity of antidromically identified prepositus hypoglossi neurons. Neurosci. Letters Suppl., 22: 255.

DELGADO-GARCIA, J.M., GOMEZ, C., TORRES, B. y PASARO, R. (1985 b): Acciones fisiológicas de motoneuronas axotomizadas del núcleo motor ocular externo en el gato despierto. J.M.R Delgado (ed.), memoria de la II reunión del FIS, págs 77-91

DELGADO-GARCIA, J.M., POZO Del, F. y BAKER, R. (1985 c): Behavior of neurons in the abducens nucleus of alert cat: I Motoneurons. Neuroscience, (en prensa).

DELGADO-GARCIA, J.M., SERRA, R. y RIBAS, J. (1982): Physiological activities of axotomized abducens motoneurons in the alert cat. Neurosci. Letters Suppl., 10: 138.

DESTOMBES, J. y RIPERT, J.P. (1977): Ultrastructural

observations of the abducens nucleus of the cat after injection of horseradish peroxidase into the lateral rectus muscle. *Exp. Brain Res.*, 28: 63-71.

DUCKER, T.B. (1980): Pathophysiology of peripheral nerve trauma. En "Peripheral nerve problems", G.E. Omer y M. Spinner (eds.), W.B. Saunders Company, Londres, págs. 475-486.

ECCLES, J.C., LIBET, B. y YOUNG, R.R. (1958): The behavior of chromatolysed motoneurons studied by intracellular recording. *J. Physiol. (Londres)*, 143: 11-40.

ELIZALDE, A., HUERTA, M. y STEFANI, E. (1983): Selective reinnervation of twitch and tonic muscle fibres of frog. *J. Physiol. (Londres)*, 340: 513-524.

EVARTS, E.V. (1968): A technique for recording activity of subcortical neurons in moving animals. *Electroenceph. Clin. Neurophysiol.*, 24: 83-86.

FARBBER, J.L. (1981): The role of calcium in cell death. *Life Sciences*, 29: 1289-1295.

FAREL, P.B. (1978): Reflex activity of regenerating frog spinal motoneurons. *Brain Res.*, 158: 331-341.

FAREL, P.B. (1980): Selective synaptic changes following spinal motoneurons axotomy. *Brain Res.*, 189: 67-77.

FERNANDEZ, C. y GOLDBERG, J.M. (1971): Physiology of peripheral neurons innervating semicircular canals of squirrel monkey. II Response to sinusoidal stimulation and dynamics of peripheral vestibular system. *J. Neurophysiol.*, 34: 661-675.

FOERSTER, A.P. (1982): Spontaneous regeneration of cut axons in adult rat brain. *J. Comp. Neurol.*, 210: 335-356.

FUCHS, A.F. y KANEKO, C.R.S. (1981): A brain stem generator for saccadic eye movements. *Trends in Neurosci.*, 38: 283-286.

FUCHS, A.F. y LUSCHEI, E.S. (1970): Firing pattern of abducens neurons of alert monkey in relationship to horizontal eye movements. *J. Neurophysiol.*, 33: 382-392.

FUCHS, A.F. y ROBINSON, D.A. (1966): A method for measuring horizontal and vertical eye movement chronically in the monkey. *J. Applied Physiol.*, 21: 1068-1070.

GAGE, F.H., DUNNETT, S.B., BRUNDIN, P., ISACSON, O. y BJORLUND, A. (1983/84): Intracerebral grafting of embryonic neural cells into the adult host brain: an overview of the cell suspension method and its application. *Develop.*

Neurosci., 6: 137-151.

GALLEGO, R. (1984): Influencia del elemento postsináptico sobre las propiedades neuronales. XX Congreso de la S.E.C.F., págs. 53-55.

GALLEGO, R., KUNO, M., NUÑEZ, R. y SNIDER, W.D. (1979): Dependence of motoneurone properties on the length of immobilized muscle. J. Physiol. (Londres), 291: 179-189.

GALLEGO, R., KUNO, M., NUÑEZ, R. y SNIDER, W.D. (1980): Enhancement of synaptic function in cat motoneurons during peripheral sensory regeneration. J. Physiol. (Londres), 306: 205-218.

GILLIAT, R.W. y HJORTH, R.J. (1972): Nerve conduction during wallerian degeneration in the baboon. J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry, 35: 335-341.

GODAUX, E. y LAUNE, J.M. (1983): The saccadic system and the vestibulo-ocular reflex in the cat do not share the same integrator. Neurosci. Letters, 38: 263-268.

GOLBERG, S.J., CLAMANN, H.P. y McCLUNG, J.R. (1981): Relation between motoneuron position and lateral rectus unit contraction speed: an intracellular study in the cat abducens nucleus. Neurosci. Letters, 23: 49-54.

GOLDBERGER, M.E. y MURRAY, M. (1982): Lack of sprouting and its presence after lesions of cat spinal cord. *Brain Res.*, 241: 227-239.

GOLDMAN, S.S., ELOWITZ, E. y FLAMM, E.S. (1983): Effect of traumatic injury on membrane phosphatase activity in cat spinal cord. *Exp. Neurol.*, 82: 650-662.

GOMEZ, C. y DELGADO-GARCIA, J.M. (1984): Comportamiento de las motoneuronas del núcleo motor ocular externo durante estimulación vestibular en el gato despierto. *Rev. Esp. Fisiol.*, 40: 141-148.

GOMEZ, C., TORRES, B., Del POZO, F. y DELGADO-GARCIA, J.M. (1984): El sistema motor ocular. I Aspectos funcionales de los movimientos oculares sacádicos. En "Actas del II simposium de ingeniería biomédica", F. Del Pozo, C. Hernández y G. Fernández (eds.), E.T.S.I. Telecomunicaciones, págs. 349-353.

GOSHGARIAN, H.G., KOISTINEN, J.M. y SCHMIDT, E.R. (1983): Cell death and changes in the retrograde transport of horseradish peroxidase in rubrospinal neurons following spinal cord hemisection in the adult rat. *J. Comp. Neurol.*, 214: 251-257.

GRAFSTEIN, B. (1975): The nerve cell body's response to axotomy. *Exp. Neurol.*, 48: 32-51.

GRAFSTEIN, B. (1983): Chromatolysis reconsidered: a new view of the retrograde reaction of the nerve cell body to axon injury. En "Nerve, organ and tissue regeneration: research perspectives", F.J. Seil (ed.), Academic Press, Inc., Londres, págs. 37-50.

GRAFSTEIN, B y McQUARRIE, I.G. (1978): Role of the nerve cell body in axonal regeneration. En "Neuronal plasticity", C.W. Cotman (ed.), Raven Press, Nueva York, págs. 155-195.

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

GRANTYN, R., GRANTYN, A. y SCHAAF, P. (1977): Conduction velocity, input resistance and size of cat ocular motoneurons stained with procion yellow. *Brain Res.*, 135: 167-173.

GRAYBIEL, A. y HARTWIEG, E.A. (1974): Some afferent connections of the oculomotor complex in the cat: an experimental study with tracer techniques. *Brain Res.*, 81: 543-541.

GUSTAFSSON, B. (1979): Changes in motoneurone electrical properties following axotomy. J. Physiol. (Londres), 293: 197-215.

GUSTAFSSON, B. y PINTER, M.J. (1984): Effects of axotomy on the distribution of passive electrical properties of cat motoneurons. J. Physiol. (Londres), 356: 433-442.

GUTH, L. (1975): History of central nervous system regeneration research. Exp. Neurol., 48: 3-15.

HAVTON, L. y KELLERTH, J.O. (1984): Retrograde effects of axotomy on the intramedullary axon collateral systems and recurrent inhibitory reflexes of cat spinal motoneurons. Neurosci. Letters, 52: 13-17.

HENN, V. y COHEN, B. (1972): Eye muscle motor neurons with different functions characteristics. Brain Res., 45: 561-568.

HENNEMAN, E., SOMJEN, G.G. y CARPENTER, D.D. (1965): Functional significance of cell size in spinal motoneurons. J. Neurophysiol., 28: 599-620.

HEYER, C.B. y LLINAS, R. (1977): Control of rhythmic firing in normal and axotomized cat spinal motoneurons. J. Neurophysiol., 40: 480-488.

HIGHSTEIN, S.M., KARABELAS, A., BAKER, R. y McCREA, R.A. (1982): Comparison of the morphology of physiologically identified abducens motor and internuclear neurons in the cat: a light microscopic study employing and intracellular injection of horseradish peroxidase. *J. Comp. Neurol.*, 208: 369-381.

HIKOSAKA, O., IGUSA, I. y IMAY, H. (1980): Inhibitory connections of nystagmus related reticular burst neurons with neurons in the abducens, prepositus hypoglossi and vestibular nuclei in the cat. *Exp. Brain Res.*, 39: 301-311.

HIKOSAKA, O., MAEDA, M., NAKAO, S., SHIMAZU, H. y SHINODA, Y. (1977): Presynaptic impulses in the abducens nucleus and their relation to postsynaptic potentials in motoneurons during vestibular nystagmus. *Exp. Brain Res.*, 27: 355-376.

HUIZAR, P., KUND, M., KUDO, N. y MIYATA, Y. (1977): Reaction of intact spinal motoneurons to partial denervation of the muscle. *J. Physiol. (Londres)*, 265: 175-191.

ITOH, K., KONISHI, A., NOMURA, A., MIZUMO, N., NAKAMURA, Y. y SUGIMOTO, T. (1979): Application of coupled oxidation reaction to electron demonstration of horseradish peroxidase: cobalt-glucose method. *Brain Res.*, 175: 341-346.

JACOBSON, M. (1978): *Developmental neurobiology*, 2nd ed.

Plenum Press, Nueva York.

JIMENEZ-RIDRUEJO, G., GOMEZ, C., DELGADO-GARCIA, J.M. y POZO Del, F. (1984): El sistema motor ocular. II modelo matemático. En "Actas del II simposium de ingeniería biomédica", F. Del Pozo, C. Hernández y G. Fernández (eds.), E.T.S.I., Telecomunicaciones, Madrid, págs. 354-360.

KANEKO, C.R.S., EVINGER, C. y FUCHS, A.F. (1981): Role of cat pontine burst neurons in generation of saccadic eye movements. *J. Neurophysiol.*, 46: 387-408.

KARNOVSKY, M.J. (1965): A formaldehyde-glutaraldehyde fixative of high osmolality for use in electron microscopy. *J. Cell Biol.*, 27: 133A-138A.

KAWAGUCHI, S., MIYATA, H., KAWAMURA, M. y HARADA, Y. (1981): Morphological and electrophysiological evidence for axonal regeneration of axotomized cerebellothalamic neurons in kittens. *Neurosci. Letters*, 25: 13-18.

KAWAMURA, Y. y DYCK, P.J. (1981): Permanent axotomy by amputation results in loss of motor neurons in man. *J. Neuropathol. and Exp. Neurol.*, 40: 658-666.

KEEFER, D.A. (1978): Horseradish peroxidase as a retrogradely transported, detailed dendritic marker. *Brain*

Res., 140: 15-32.

KELLY, J.P. (1981): Reactions of neurons to injury. En "Principles of neural science", E.R. Kandel, J.H. Schwartz (eds.), Elsevier North Holland, Inc., Nueva York, págs. 138-146.

KERNELL, D. (1965): High frequency repetitive firing of the cat lumbosacral motoneurons stimulated by long lasting injected currents. Acta Physiol. Scand., 65: 74-86.

KEYNES, R.J., HOPKINS, W.G. y BROWN, M. (1983): Sprouting of mammalian motoneurons at nodes of ranvier: the role of denervated motor endplate. Brain Res., 264: 209-213.

KLUVER, H. y BARRERA, E. (1953): A method for the combined staining of cells and fibers in the nervous system. J. Neuropath. Exp. Neurol., 12: 400-403.

KRASNE, F.B. y LEE, S.H. (1977): Regenerating afferents establish synapses with a target neuron that lacks its cell body. Science, 198: 517-519.

KUNO, M. y LLINAS, R. (1970 a): Enhancement of synaptic transmission by dendritic potential in chromatolysed motoneurons of the cat. J. Physiol. (Londres), 210: 807-821.

KUND, M. y LLINAS, R. (1970 b): Alterations of synaptic action in chromatolysed motoneurons of the cat. *J. Physiol. (Londres)*, 210: 823-838.

KUND, M., MIYATA, Y. y MUÑOZ-MARTINEZ, E.J. (1974): Differential reaction of fast and slow α -motoneurons to axotomy. *J. Physiol. (Londres)*, 240: 725-739.

KUWADA, J.Y. (1981): Ionic and metabolic dependence of axotomy-induced somatic changes in crayfish. *J. Physiol. (Londres)*, 317: 463-473.

KUWADA, J.Y. y WINE, J.J. (1981): Transient axotomy-induced changes in the membrane properties of crayfish central neurones. *J. Physiol. (Londres)*, 317: 435-461.

LANNOU, J., CAZIN, L., PRECHT, W. y LE TAILLANTER, M. (1984): Responses of prepositus hypoglossi neurons to optokinetic and vestibular stimulations in the rat. *Brain Res.*, 301: 39-45.

LEIGH, J. y ZEE, D.S. (1983): The neurology of eye movements. F.A. Davis Company, Filadelfia.

LEVI-MONTALCINI, R. y CALISSANO, P. (1979): The nerve growth factor. *Scientific American*, 240: 44-53.

LIEBERMAN, A.R. (1971): The axon reaction: a review of the principal features of perikaryal responses to axon injury. *Int. Rev. Neurobiol.*, 14: 49-123.

LISNEY, S.J.W. (1983 a): Changes in somatotopic organization of cat lumbar spinal cord following peripheral nerve transection and regeneration. *Brain Res.*, 259: 31-39.

LISNEY, S.J.W. (1983 b): The cat lumbar spinal cord somatotopic map is unchanged after peripheral nerve crush and regeneration. *Brain Res.*, 271: 166-169.

LOPEZ-BARNEO, J., DARLOT, C., BERTHOZ, A. y BAKER, R. (1982): Neural activity in prepositus nucleus correlated with eye movements in the alert cat. *J. Neurophysiol.*, 47: 329-352.

LORENTE DE NO, R. (1933): Vestibulo ocular reflex arc. *Arch. Neurol. Psychiat.*, 30: 245-291.

LOVE, S. (1983): An experimental study of peripheral nerve regeneration after X-irradiation. *Brain Res.*, 106: 39-54.

LUBINSKA, L. (1982): Patterns of wallerian degeneration of myelinated fibres in short and long peripheral stumps and in isolated segments of rat phrenic nerve. Interpretation of the role of axoplasmic flow of trophic factor. *Brain Res.*,

233: 227-240.

LUNDBORG, G., LONGO, F.M. y VARON, S. (1982): Nerve regeneration model and trophic factors in vivo. Brain Res., 232: 157-161.

LUNDQUIST, L. y JOSEFSSON, J.O. (1971): Sensitive method for determination of peroxidase activity in tissue by means of coupled oxidation reaction. Anal. Biochem., 41: 567-577.

LUSCHEI, E.S. y FUCHS, A.F. (1972): Activity of brain stem neurons during eye movements of alert monkeys. J. Neurophysiol., 35: 455-461.

MACIEWIZ, R.J., EAGEN, K., KANEKO, C.R.S. y HIGHSTEIN, S.M. (1977): Vestibular and medullary brain stem afferents to the abducens nucleus in the cat. Brain Res., 123: 229-240.

MACIEWIZ, R.J. y PHIPPS, B.S. (1983): The oculomotor internuclear pathway: a double retrograde labeling study. Brain Res., 262: 1-8.

MATTHEWS, M.R. y NELSON, V.H. (1975): Detachment of structurally intact nerve endings from chromatolytic neurons of the rat cervical ganglion during the depression of synaptic transmission induced by postganglionic axotomy. J. Physiol. (Londres), 245: 91-135.

MAYS, L.E. (1984): Neural control of vergence eye movements: convergence and divergence neurons in midbrain. *J. Neurophysiol.*, 51: 1091-1108.

McCREA, R., BAKER, R. y DELGADO-GARCIA, J.M. (1979): Afferents and efferents organization to the prepositus hypoglossi nucleus. *Prog. Brain Res.*, 50: 653-665.

McQUARRIE, I.G. (1983): Role of the axonal cytoskeleton in the regenerating system. En "Nerve, organ and tissue regeneration: research perspectives", E.J. Seil (ed.), Academic Press, Inc., Nueva York, págs. 51-68.

MEDINACELLI De, L. y FREED, W.J. (1983): Peripheral nerve reconnection: immediate histologic consequences of distributed mechanical support. *Exp. Neurol.*, 81: 459-468.

MEDINACELLI De, L., FREED, W.J. y WYATT, R.J. (1983 a): Peripheral nerve reconnection: improvement of long-term functional effects under simulated clinical conditions in the rat. *Exp. Neurol.*, 81: 488-496.

MEDINACELLI De, L., WYATT, R.J. y FREED, W.J. (1983 b): Peripheral nerve reconnection: mechanical, thermal, and ionic conditions that promote the return of function. *Exp. Neurol.*, 81: 469-487.

MENDELL, L.M., MUNSON, J.B. y SCOTT, J.G. (1974): Connectivity changes of Ia afferent on axotomized motoneurons. *Brain Res.*, 73: 338-342.

MENDELL, L.M., MUNSON, J.B. y SCOTT, J.G. (1976): Alterations of synapses on axotomized motoneurons. *J. Physiol. (Londres)*, 255: 67-79.

MESULAM, M.M. (1982): Tracing neural connections with horseradish peroxidase. M.M. Mesulam (ed.), J. Wiley & Sons, Nueva York.

MESULAM, M.M. y ROSENE, D.L. (1979): Sensitivity in horseradish peroxidase neurohistochemistry: a comparative and quantitative analysis of nine methods. *J. Histochem. Cytochem.*, 27: 763-773.

MIZUMO, N., UEMURA-SUMI, M., MATSUDA, K., TAKEUCHI, Y., KUNE, M. y MATSUSHINA, R. (1980): Non-selective distribution of hypoglossal nerve fibers after section and resuture: a horseradish peroxidase study in the cat. *Neurosci. Letters*, 19: 33-37.

MORALES, A., IVORRA, I. y GALLEGU, R. (1985): Recovery of normal electrophysiological properties in petrosal ganglion sensory neurons of the cat following reinnervation of the carotid body. *Neurosci. Letters Suppl.*, 22: 523.

NELSON, S.G. y MENDELL, L.M. (1979): Enhancement in Ia-motoneuron synaptic transmission caudal to chronic spinal cord transection. *J. Neurophysiol.*, 42: 642-654.

NELSON, S.G., COLLATOS, T.C., NIETCHAT, A. y MENDELL, L.M. (1979): Immediate increase in Ia-motoneuron synaptic transmission caudal to spinal cord transection. *J. Neurophysiol.*, 42: 655-664.

NIX, W.A. y HOPT, H.C. (1983): Electrical stimulation of regenerating nerve and its effect on motor recovery. *Brain Res.*, 272: 21-25.

PASARO, R., TORRES, B. y DELGADO-GARCIA, J.M. (1983): Location of short neck motoneurons in the cat revealed by horseradish peroxidase. *Neurosci. Letters*, 43: 131-133.

PASARO, R., TORRES, B. y DELGADO-GARCIA (1985): Morphological effects of V1th nerve section in the kitten as revealed by horseradish peroxidase. *Neurosci. Letters*, 58: 207-211.

PELLEGRINO, M., BRUNETTA, N. y MATTEOLI, M. (1984): Response to axotomy of an identified leech neuron, in vivo and in culture. *Brain Res.*, 298: 347-352.

PORTER, J.D., GUTHRIE, B.L. y SPARKS, D.L. (1985): Selective

retrograde transneuronal transport of wheat germ agglutinin-conjugated horseradish peroxidase in the oculomotor system. *Exp. Brain Res.*, 57: 411-416.

PRECHT, W. (1979): Vestibular mechanism. *Ann. Rev. Neurosci.*, 2: 265-289.

PRECHT, W., RICHTER, A. y GRIPPO, J. (1969): Responses of neurones in cat's abducens nuclei to horizontal angular acceleratum. *Pflugers. Arch.*, 309: 285-309.

PURVES, D. (1975): Functional and structural changes in mammalian sympathetic neurones following interruption of their axons. *J. Physiol. (Londres)*, 252: 429-463.

PURVES, D. y LICHTMAN, J.W. (1978): Formation and maintenance of synaptic connections in autonomic ganglia. *Physiol. Rev.*, 58: 821-862.

PURVES, D. y THOMPSON, W. (1979): The effects of post-ganglionic axotomy on selective synaptic connexions in the superior cervical ganglion of the guinea pig. *J. Physiol. (Londres)*, 297: 95-110.

RALL, W. (1959): Branching dendritic tree and motoneuron membrane resistivity. *Exptl. Neurol.*, 1: 491-527.

RALL, W., BURKE, R.E., SMITH, T.G., NELSON, P.G. y FRANK, K. (1967): Dendritic location of synapses and possible mechanism for the monosynaptic EPSP in motoneurons. *J. Neurophysiol.*, 30: 1169-1193.

RAMON Y CAJAL, S. (1911): *Histologie du systeme nerveux de l'homme et des vertebrés*. Maloine, Paris.

RAMON Y CAJAL, S. (1914): *Degeneración y regeneración del sistema nervioso*. Nicolás Moya, Madrid.

REDSHAW, J.D. y BISBY, M.A. (1985): Comparison of the effects of sciatic nerve crush and resection on the proteins of fast axonal transport in rat dorsal root ganglion cell axons. *Exp. Neurol.*, 88: 437-446.

REIS, D.J., ROSS, R.A., GILAD, G. y JOH, T.H. (1978): Reactions of central catecholaminergic neurons to injury: model systems for studying the neurobiology of central regeneration and sprouting. En "Neuronal Plasticity", C.W. Cotman (ed.), Raven Press, Nueva York, págs. 197-226.

REISERT, I., WILDEMANN, G., CRAB, D. y PILGRIM, CH. (1984): The glial reaction in the course of axon regeneration: a stereological study of the rat hypoglossal nucleus. *J. Comp. Neurol.*, 229: 121-128.

RHOADES, R.W., FIORE, J.M., MATH. M.F. y JACQUIN, M.F. (1983): Reorganization of trigeminal primary afferents following neonatal infraorbital nerve section in hamster. *Develop. Brain Res.*, 7: 337-342.

RIBAS, J., SERRA, R. y DELGADO-GARCIA, J.M. (1982): Actividad de motoneuronas axotomizadas del núcleo motor ocular externo en el gato despierto. *Rev. Esp. Fisiol.*, 38: 303-310

RICHARDSON, P.M., ISSA, V.M.K. y SHEMIE, S. (1982): Regeneration and retrograde degeneration of axons in the rat optic nerve. *J. Neurocytol.*, 11: 949-966.

RICHTER, D.W., SCHLUE, R.W., MAURITZ, K.H. y NACIMIENTO, A.C. (1974): Composition of membrane properties of the cell body and initial part of the axon of the phasic motoneurons in the spinal cord of the cat. *Exptl. Brain Res.*, 20: 193-200.

ROBINSON, D.A. (1963): A method of measuring eye movement using a scleral search coil in a magnetic field. *IEEE Trans on Biomed. Electron.*, 10: 137-145.

ROBINSON, D.A. (1968): The oculomotor control system. A review. *Proc. IEEE*, 56: 1032-1059.

ROBINSON, D.A. (1970): Oculomotor unit behavior in the monkey. *J. Neurophysiol.*, 33: 393-404.

ROBINSON, D.A. (1981): The use of control systems analysis in the neurophysiology of eye movements. *Ann. Rev. Neurosci.*, 4: 463-503.

ROEDERER, E. y COHEN, M.J. (1983): Regeneration of an identified central neuron in the cricket. II Electrical and morphological response of the soma. *J. Neurosci.* 3: 1848-1859.

SCHILLER, R.H. (1970): The discharge characteristics of single units in the oculomotor and abducens nuclei of unanesthetized monkey. *Exp. Brain Res.*, 10: 347-362.

SCHMIDT, R.H., BJORKLUND, A., STEVENI, V. y DUNNETT, S.B. (1983): Intracerebral grafting of dissociated CNS tissue suspensions. En "Nerve, organ, and tissue regeneration: research perspectives", E.J. Seil (ed.), Academic Press, Inc., Nueva York, págs. 325-357.

SELZER, M.E. (1980): Regeneration of peripheral nerve. En "The physiology of peripheral nerve disease", A.J. Sumner (ed.), W.B. Saunders Co., Filadelfia, págs. 359-431.

SERRA, R. (1982): Fisiología del núcleo motor ocular externo

en el gato. Tesis doctoral, Universidad de Sevilla, Sevilla.

SERRA, R., RIBAS, J. y DELGADO-GARCIA, J.M. (1982): Efectos de la axotomía sobre los potenciales de campo del núcleo motor ocular externo en el gato despierto. *Rev. Esp. Fisiol.*, 38: 295-302.

SHINODA, Y. y YOSHIDA, K. (1974): Dynamic characteristics of responses to horizontal head angular acceleration in the vestibular pathway in the cat. *J. Neurophysiol.*, 37: 653-373.

SIMONATI, A., RIZZUTO, N. y CAVANAGH, J.B. (1983): The effects of 2,5-Hexanedione on axonal regeneration after nerve crush in the rat. *Acta Neuropathol.*, 59: 216-224.

SKAVENSKI, A.A. y ROBINSON, D.A. (1973): Role of abducens nucleus neurons in vestibulo ocular reflex. *J. Neurophysiol.*, 59: 724-738.

SKENE, J.M.P. y WILLARD, M. (1981): Changes in axonally transported proteins during regeneration in toad retinal ganglion cells. *J. Cell Biol.*, 89: 86-95.

SMITH, C.B., CRANE, A.M., KADEKARD, M., AGRANOFF, B.W. y SOKOLOFF, L. (1984): Stimulation of protein synthesis and glucose utilization in the hypoglossal nucleus induced by axotomy. *J. Neurosci.*, 4: 2489-2496.

SMITH, K.J. y HALL, S.M. (1980): Nerve conduction during peripheral demyelination and remyelination. *J. Neurol. Sci.*, 48: 201-219.

SMOLEN, A.J. y TRUEX, R. (1977): The dorsal motor nucleus of the vagus nerve of the cat: localization of preganglionic neurons by quantitative histological methods. *Anat. Record*, 189 (4): 555-565.

SPENCER, R.F. y STERLING, P. (1977): An electron microscope study of motoneurons and interneurons in the cat abducens nucleus identified by retrograde intraaxonal transport of horseradish peroxidase. *J. Comp. Neurol.*, 176: 65-86.

SPENCER, P.S. y WEINBERG, H.J. (1978): Axonal specification of schwann cell expression and myelination. En "Physiology and pathobiology of axons", S.G. Waxman (ed.), Raven Press, Inc., Nueva York, págs. 389-405.

SPERRY, R.W. (1941): The effect of crossing nerves to antagonist muscles in the hind limb of the rat. *J. Comp. Neurol.*, 75: 1-19.

SPERRY, R.W. (1942): Transplantation of motor nerves and muscles in the forelimb of the rat. *J. Comp. Neurol.*, 76: 283-321.

SPERRY, R.W. (1945): The problem of central nervous reorganization after nerve regeneration and muscle transposition. *Quarterly Rev. Biol.*, 20: 311-369.

SPERRY, R.W. (1951): Mechanism of neural maturation. En "Handbook of experimental psychology", S.S. Stevens (ed.), Nueva York, págs. 236-280.

STANDLER, N. y BERNSTEIN, J.J. (1982): Degeneration and regeneration of motoneuron dendrites after ventral crush: computer reconstruction of dendritic fields. *Exp. Neurol.*, 75: 600-615.

STEIGER, H.J. y BUTTNER-ENNEVER, J. (1978): Relationship between motoneurons and internuclear neurons in the abducens nucleus. A double retrograde tracer study in the cat. *Brain Res.*, 148: 181-188.

STEIN, R.B. y BERTOLDI, R. (1981): The size principle: a synthesis of neurophysiological data. En "Motor unit types, recruitment and plasticity in health and disease", J.E. Desenont (ed.), *Prog. Clin. Neurophysiol.*, 9: 85-96.

STERMAN, A.B. y SPOSITO, N. (1984): Motoneuron axosomatic synapses are altered in axonopathy. *J. Neuropathol. and Exp. Neurol.*, 43: 201-209.

STRAUS, W. (1964): Factors affecting the cytochemical reaction of peroxidase with benzidine and stability of blue reaction product. *J. Histochem. Cytochem.*, 12: 462-469.

SUMNER, A.J. (1980): *Peripheral nerve disease*. W.B. Saunders, Co., Philadelphia.

SUMNER, B.H.E. (1975 a): A quantitative analysis of the response of presynaptic boutons to postsynaptic motor neuron axotomy. *Exp. Neurol.*, 46: 605-615.

SUMNER, B.H.E. (1975 b): An ultrastructural study of normal and injured hypoglossal nuclei after injection of horseradish peroxidase. *Exp. Brain Res.*, 23: 463-470.

SUMNER, B.H.E. (1976): Quantitative ultrastructural observations on the inhibited recovery of the hypoglossal nucleus from axotomy response when regeneration of the hypoglossal nerve is prevented. *Exp. Brain Res.*, 26: 141-150.

SUMNER, B.H.E. y WATSON, W.E. (1971): Retraction and expansion of the dendritic tree of motor neurons of adult rats induced in vivo. *Nature*, 233: 273-275.

SUNDERLAND, S. (1978): *Nerves and nerve injuries*, 2nd edition. Churchill Livingstone, Londres.

TAKATA, M. y NAGAHAMA, T. (1983): Synaptic efficacy of inhibitory sinapses in hipoglossal motoneurons after transection of the hipoglossal nerves. *Neuroscience*, 10: 23-29.

TAKATA, M., SHOHARA, E. y FUJITA, S. (1980): The excitability of hipoglossal motoneurons undergoing chromatolysis. *Neuroscience*, 5: 413-419.

TORRES, B., GOMEZ, C. y DELGADO-GARCIA, J.M. (1985 a): Actividad de las motoneuronas axotomizadas del núcleo motor ocular externo durante movimientos sacádicos. *Rev. Esp. Fisiol.*, 41: 73-82.

TORRES, B., GOMEZ, C. y DELGADO-GARCIA, J.M. (1985 b): Behavioral activities of axotomized abducens motoneurons in the alert cat. *Brain Res.*, (en prensa)

TORVIK, A. y SKJORTEN, F. (1971): Electron microscopic observations on nerve cells regeneration and degeneration after axon lesions. II Changes in glial cells. *Acta Neuropathol.*, 17: 265-282.

TRUEX, R.C., CARPENTER, M.B. y MOSOVICH, A. (1976): *Neuroanatomía humana*. El Ateneo, págs. 357-365.

TSUGE, K. (1980): Special surgical techniques: special suture technique. En "Peripheral nerve problems", W.B. Saunders Co. (ed.), Londres, págs. 443-449.

TSUKAHARA, N. y FUJITO, Y. (1976): Physiological evidence of formation of new synapses from cerebrum in the red nucleus neurons following cross-union of forelimb nerve. Brain Res., 106: 184-188.

TYC-DUMONT, S. y DELL, P. (1961): Analyse electrophysiologique de l'arc reflexe vestibulo-oculaire. J. Physiol. (Paris), 53: 316-317.

VAN GISBERGEN, J.A.M., ROBINSON, D.A. y GIELEN, S. (1981): A quantitative analysis of saccadic eye movements by burst neurons. J. Neurophysiol., 45: 417-442.

WATSON, W.E. (1968): Observations on the nucleolar and total cell body nuclei acid of injured nerve cells. J. Physiol. (Londres), 196: 655-676.

WATSON, W.E. (1974): Cellular response to axotomy and to related procedures. Brit. Med. Bull., 30: 112-115.

WEBER, A.J. y KALIL, R.E. (1983): The percentage of interneurons in the dorsal lateral geniculate nucleus of the cat and observations on several variables that affect the

sensitivity of horseradish peroxidase as a retrograde marker. J. Comp. Neurol., 220: 336-346.

WELLS, M.R. (1984): Alteration of (3H) actinomycin D binding to axotomized dorsal root ganglion cell nuclei: an autoradiographic method to detect changes in chromatin structure and RNA synthesis. Exp. Neurol., 86: 303-312.

YGGE, J. y ALDSKOGIUS, H. (1984): Intercostal nerve transection and its effect on the dorsal root ganglion. A quantitative study on thoracic ganglion cell numbers and sizes in the rat. Exp. Brain Res., 55: 402-408.

YIN, H.S. y SELZER, M.E. (1984): Electrophysiological evidence of regeneration of lamprey spinal neurons. Exp. Neurol., 83: 618-628.

YOSHIDA, K., McCREA, R., BERTHOZ, A. y VIDAL, P.P. (1979): Morphological and physiological characteristics of burst inhibitory neurons in the alert cat. Soc. Neurosci. Abst., 5:391.

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MEXICO
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

Reunido el Tribunal Promovido por Lic. ...

Dr. Blas Torres Ruiz

"Fisiología de la respuesta neuronal a la lesión VI por craneal en el gato"

... la calificación de Apto con laude

Berlín 16 de Diciembre

85

~~Chap~~

~~Tallego~~

Rubio

Duo

Ribas

Blas Ruiz