



**ESTRATEGIAS REPARATIVAS EN EL SISTEMA
OCULOMOTOR TRAS LA LESIÓN MEDIANTE LA
ADMINISTRACIÓN DEL FACTOR DE
CRECIMIENTO DEL ENDOTELIO VASCULAR
(VEGF)**

**REPAIR STRATEGIES IN THE OCULOMOTOR
SYSTEM AFTER INJURY THROUGH THE
ADMINISTRATION OF THE VASCULAR
ENDOTHELIUM GROWTH FACTOR (VEGF)**

TESIS DOCTORAL

Paula Martín Calvo
Facultad de Biología
Departamento de Fisiología

Sevilla 2021



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

ROSA M^a RODRÍGUEZ DE LA CRUZ, Catedrática del Dpto. de Fisiología de la Facultad de Biología, Universidad de Sevilla.

CERTIFICAN:

Que Dña. Paula Martín Calvo, Licenciada en Biología por la Universidad de Sevilla, ha realizado bajo su dirección y supervisión el trabajo titulado “Estrategias reparativas en el sistema oculomotor tras la lesión mediante la administración del factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF)”, considerando que reúne todas las condiciones necesarias para ser presentado y defendido como Tesis Doctoral.

Sevilla, 8 de febrero de 2021.

Fdo: Ángel Manuel Pastor Loro

Fdo: Rosa M^a Rodríguez de la Cruz

Mi más sincero agradecimiento a mis directores, Ángel y Rosa,
sin su apoyo y sabios consejos este trabajo no hubiese salido adelante.

Gracias por vuestro cariño y generosidad en cada momento,
sin ellos, yo no hubiese salido adelante.

Gracias a la *Gordi*, por formar parte de este trabajo y de mi vida. Porque cada
mañana, no importe cómo amanezca el día o lo loco que se despierte el
mundo, hace que me despierte con una sonrisa.

Gracias a todo aquel que algún día formó parte de esta aventura, cada
experiencia cuenta y me acompañará el resto de mi vida.

A mi familia
y a Estrella

IF YOUR NERVE, DENY YOU

GO ABOVE YOUR NERVE

▣ Dickinson

ABREVIATURAS

ANOVA: test de análisis de la varianza

BDNF: factor neurotrófico derivado del cerebro

CDNF: factor neurotrófico cerebral de dopamina

ChAT: colina acetiltransferasa

DAP: protocolo de administración tardía

ELA: esclerosis lateral amiotrófica

F0: frecuencia de disparo con la mirada en el centro de la órbita (a cero grados)

FRPP: formación reticular paramediana pontina

FRPB: formación reticular paramediana bulbar

GDNF: factor neurotrófico derivado de la línea celular glial

HIF: factor de transcripción inducido por hipoxia

HRE: elemento de respuesta a hipoxia

IAP: protocolo de administración inmediata

k_s: sensibilidad neuronal a la posición ocular durante movimientos espontáneos

k_v: sensibilidad neuronal a la posición ocular durante estimulación vestibular

MANF: factor neurotrófico mesencéfalo derivado de astrocitos

MIF: fibra muscular multi-inervada

NBE: neurona de brote excitador

NBI: neurona de brote inhibidor

NGF: factor de crecimiento nervioso

NMOC: núcleo motor ocular común

NMOE: núcleo motor ocular externo

NRP: neuropilinas

NT-3: neurotrofina -3

NT-4/5: neurotrofina -4/5

PDGF: factor de crecimiento derivado de plaquetas

PIGF: factor de crecimientoplacentar growth factor

r_s: sensibilidad neuronal a la velocidad ocular durante movimientos espontáneos

r_v: sensibilidad neuronal a la velocidad ocular durante estimulación vestibular

SEM: error estándar de la media

SIF: fibra muscular mono-inervada

Th: umbral de reclutamiento

VEGF: factor de crecimiento del endotelio vascular

VEGFR: receptor de VEGF

VN: núcleo vestibular medial

VPF: factor de permeabilidad vascular

ÍNDICE

ÍNDICE

RESUMEN	1
ABSTRACT	3
INTRODUCCIÓN	7
1. MODELO EXPERIMENTAL: EL SISTEMA OCULOMOTOR.....	7
1.1. Movimientos oculares	8
1.1.1. Movimientos de estabilización de la mirada o compensatorios	8
1.1.2. Movimientos de desplazamiento de la mirada	11
1.2. Estructura anatómica del sistema oculomotor	15
1.2.1. Músculos extraoculares	15
1.2.2. Núcleos oculomotores	21
1.2.3. Aferencias al NMOE	24
1.2.4. Axotomía periférica del NMOE	28
2. TEORÍA TRÓFICA DE LAS CONEXIONES NEURALES	29
2.1. Familia del factor de crecimiento del endotelio vascular	32
2.2 Receptores de VEGF (VEGFRs).....	33
2.3. Acciones biológicas y regulación del VEGF-A.....	36
2.4. VEGF y esclerosis lateral amiotrófica (ELA)	39
2.5. Biología del VEGF-B	43
OBJETIVOS	49
AIMS OF THE PRESENT PROJECT	53
MATERIALES, MÉTODOS Y RESULTADOS	57
Capítulo I.....	57
Capítulo II.	61
Capítulo III.....	65
Capítulo IV.....	69
ANNEXES	76
Annex I.....	76
Annex II	78
RESUMEN DE RESULTADOS	83
SUMMARY OF RESULTS	93
DISCUSIÓN GLOBAL	103
CONCLUSIONES FINALES	115
FINAL CONCLUSIONS	119
BIBLIOGRAFÍA	123

RESUMEN

El factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF) es una proteína englobada en la familia de los factores tróficos. En un principio se describió como un factor implicado en procesos de vasculogénesis, angiogénesis y permeabilidad vascular. Actualmente, se conoce que ejerce sus funciones en numerosos tejidos, especialmente el nervioso, donde existe una fuerte relación entre VEGF y enfermedades neurodegenerativas. Es de especial interés el papel que juega el VEGF en la esclerosis lateral amiotrófica (ELA). Esta enfermedad produce una degeneración progresiva de las motoneuronas que conlleva un debilitamiento de los músculos y finalmente la muerte del individuo. Ratones transgénicos con bajos niveles de expresión de VEGF desarrollan síntomas similares a los de la ELA; en ellos, la administración exógena de VEGF y las estrategias para producir su sobreexpresión, reducen significativamente la muerte de las motoneuronas, aumentan su supervivencia y alargan la esperanza de vida. Lo que se desconoce, hasta la fecha, es el estado funcional en el que se encuentran estas motoneuronas, y el registro neurofisiológico sería una potente técnica para su estudio *in vivo*.

Es por ello que nos propusimos evaluar si la administración exógena de VEGF en un modelo experimental de lesión de motoneuronas del núcleo motor ocular externo (NMOE) produce una recuperación, tanto de las propiedades de disparo como de los contactos sinápticos aferentes. Para este estudio morfo-fisiológico se usó la preparación crónica del gato alerta, en la cual se comprobó el efecto de la administración de dos miembros de la familia del VEGF con efectos conocidos a nivel neuronal: el VEGF-A (miembro prototipo de la familia, también llamado simplemente VEGF) y el VEGF-B, el cual tiene la ventaja de tener menor actividad angiogénica. La administración se realizó siguiendo dos protocolos temporales distintos: i) administración inmediata, en el cual la administración de VEGF-A y VEGF-B se produjo inmediatamente tras la lesión, permitiendo así evaluar el grado de prevención que estos factores tienen sobre los efectos producidos por la lesión; y ii) administración tardía, en el cual se dejó pasar un periodo de tiempo tras la lesión antes de administrar VEGF-A, con el fin de comprobar su capacidad para revertir los efectos de la lesión. Este último es el que mayor interés terapéutico tiene.

Así mismo, se realizó un estudio morfofuncional de los dos tipos de motoneuronas del núcleo estudiado, MIF y SIF, con el fin de determinar su distribución en el núcleo y sus diferencias en las características de disparo y en los contactos sinápticos aferentes, que se completó con una aproximación a la respuesta de cada tipo de motoneurona al VEGF bajo condiciones de lesión.

ABSTRACT

Vascular endothelial growth factor (VEGF) is a member of the family of trophic factors. It was initially described as a factor involved in processes of vasculogenesis, angiogenesis, and vascular permeability. Currently, it is known that VEGF exerts its functions in numerous tissues, especially in the nervous system, where there is a strong relationship between VEGF and neurodegenerative diseases. Of particular interest is the role that VEGF plays in amyotrophic lateral sclerosis (ALS). This disease produces a progressive degeneration of the motoneurons that leads to a weakening of the muscles and finally to death. Transgenic mice with low levels of VEGF expression develop symptoms similar to those of ALS. In these mice, the exogenous administration of VEGF and the strategies to produce its overexpression, significantly reduce the death of motoneurons, increase their survival and the lifespan of the animals. What it is unknown, to date, is the functional state of these motoneurons, and the neurophysiological recordings would be a powerful technique for their *in vivo* study.

That is why we set out to evaluate whether the exogenous administration of VEGF in an experimental model of motoneuron lesion of the abducens nucleus produces a recovery of both the firing properties and the afferent synaptic contacts. For this morphophysiological study, the chronic preparation of the alert cat was used, in which the effects of the administration of two members of the VEGF family with known effects at the neuronal level were verified: VEGF-A and VEGF-B, the latter has the advantage of having less angiogenic activity. The administration was carried out following two different time protocols: i) immediate administration, in which the administration of VEGF-A and VEGF-B occurred immediately after injury, thus allowing to evaluate the degree of prevention that these factors have on the effects produced by the injury; and ii) delayed administration, in which a period of time elapsed after the injury before VEGF-A was administered, in order to check its ability to reverse the effects of the injury.

Likewise, a morphofunctional study of the two types of motoneurons present in the studied nucleus, MIF and SIF, was carried out in order to determine their distribution in the nucleus and their differences in firing characteristics and in afferent synaptic contacts, which was completed with an approximation to the response of each type of motoneuron to VEGF under injured conditions.

INTRODUCCIÓN

INTRODUCCIÓN

1. MODELO EXPERIMENTAL: EL SISTEMA OCULOMOTOR

El sistema oculomotor está constituido por los músculos que mueven al ojo y los núcleos cerebrales que contienen los somas de las motoneuronas, cuyos axones inervan dichos músculos. Su función consiste en permitir al individuo la correcta captación visual del medio que le rodea ante movimientos de la escena visual, del propio observador o de una combinación de ambos.

Es un sistema sometido a fuerte presión evolutiva. En los primeros vertebrados ya existía un reflejo vestibular encargado de compensar el movimiento de la cabeza (Walls, 1962), que se generaba a partir de señales provenientes de la ampolla del canal semicircular del aparato vestibular, y su función era mantener la imagen estable con respecto al medio. Citando a Walls acerca del origen de los movimientos oculares: ‘... tienen como base la necesidad de fijar una imagen en la retina, no la necesidad de explorar el medio’ (Walls, 1962).

El sistema oculomotor es un modelo útil para el estudio del control del movimiento, ya que cada músculo tiene un papel específico en el movimiento ocular, y en su conjunto, estos músculos generan movimientos oculares estereotipados. Es un modelo relativamente sencillo y bien definido en el que la entrada al sistema (estímulo), la salida generada (movimiento ocular) y el proceso que discurre entre ambos estados (red neuronal) son bien conocidos y están extensamente descritos.

Sin embargo, esto es solo una simplificación del complejo sistema involucrado tanto en los movimientos compensatorios de cabeza y ojos que permiten “estabilizar” la mirada como en aquellos movimientos que permiten “desplazar” la mirada, consiguiendo con ello mantener la imagen fija en la retina para dar lugar a una visión nítida. Es así como los resultados del estudio de un modelo simple pueden ser trasladados a conductas motoras más complejas que implican, entre otros, al sistema vestibular o la integración sensoriomotora en el colículo superior.

Los trabajos del presente proyecto están centrados en el estudio de uno de los elementos del sistema oculomotor: i) el núcleo motor ocular externo (NMOE); ii) la reacción de sus motoneuronas ante una lesión de axotomía; y iii) la respuesta de estas motoneuronas lesionadas tras la administración del factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF).

Se trata de un modelo muy desarrollado y bien conocido en el laboratorio donde se realizaron los experimentos del presente proyecto.

1.1. Movimientos oculares

1.1.1. Movimientos de estabilización de la mirada o compensatorios

Son aquellos movimientos oculares compensatorios que permiten la estabilización de la mirada durante: i) movimientos de cabeza, generando el llamado reflejo vestíbulo-ocular; ii) movimientos del campo visual, produciendo el reflejo optocinético. En el primero, el estímulo que desencadena el movimiento es la aceleración angular de la cabeza detectada a través de las células sensoriales en los canales semicirculares, en el segundo caso, lo es la señal de error producida por el desplazamiento de la imagen sobre la retina.

La aparición del reflejo optocinético supuso, junto al reflejo vestíbulo-ocular, la creación de un sistema de doble estabilización de la imagen, y, por tanto, parece que su evolución fue pareja. El origen del reflejo optocinético podría residir en el procesamiento lento de los fotorreceptores con tiempos de respuesta superiores a 20 ms (Friedburg y col., 2004), de manera que, si los ojos se mueven pasivamente con la cabeza, la imagen aparecería borrosa al desplazarse sobre la retina (Walls, 1962). Así mismo, se sabe que la agudeza visual se deteriora con desplazamientos de la imagen de tan solo 2-3 grados/s (Westheimer y McKee, 1975; Simpson, 1984), por lo que es importante que exista un buen sistema de control oculomotor. Respecto al reflejo vestíbulo-ocular es importante destacar que la mecánica del aparato vestibular, que detecta la aceleración angular, es incapaz de responder correctamente ante bajas frecuencias de movimiento (<0.01 Hz), velocidades constantes y/o rotación continuada (Dichgans y col., 1973). Sin embargo, el reflejo optocinético funciona mejor a bajas frecuencias, de manera que ambos reflejos se complementan funcionalmente, además de hacerlo fisiológicamente en los núcleos vestibulares donde ambas señales, vestibular y visual, se combinan (Weaspe y Henn, 1977). Es decir, ambos sistemas se coordinan e interaccionan para obtener una representación interna del movimiento que finalmente se traduce en movimientos oculares compensatorios (Giolli y col., 2006).

Reflejo vestíbulo-ocular

El reflejo vestíbulo-ocular es el mecanismo neuronal por el que se compensa con movimientos oculares los movimientos de la cabeza, de manera que la imagen permanezca estable en la retina y no se produzca una visión borrosa. Es posiblemente el reflejo

oculomotor más primitivo y consiste en un circuito trineuronal compuesto por: i) la aferencia vestibular de primer orden, cuyo soma está en el ganglio de Scarpa, que proyecta a través del nervio del octavo par craneal sobre ii) la neurona de segundo orden del núcleo vestibular desde donde se generan vías directas inhibitorias o activadoras hacia iii) la motoneurona extraocular que inerva al músculo extraocular (Lorente de Nó, 1938; Büttner-Ennever y col., 1981). Es un reflejo que funciona a modo de lazo abierto ya que no está dotado de sistemas de retroalimentación mediante copias motoras eferentes. Sin embargo, se sabe que a nivel central existe una retroalimentación visual o motora que permite re-calibrar de forma continua la respuesta vestíbulo-ocular. Dicha asociación de estímulos, visual y vestibular, es un modelo básico de aprendizaje motor que ha sido demostrado en todas las especies estudiadas, como mono, conejo y carpín dorado (Gonshor y Melvill, 1976; Miles y Eighmy, 1980; Ito, 1982; Schairer y Bennett, 1986; Pastor y col., 1992).

El estímulo que desencadena este reflejo es la detección de una aceleración angular por parte de los canales semicirculares del aparato vestibular. El aparato vestibular es una estructura bilateral formada, en la mayoría de vertebrados, por tres canales semicirculares, que, junto al utrículo y sáculo, forman un circuito con continuidad entre sus partes, y cuyo interior se encuentra bañado por un líquido de composición similar al líquido intracelular, de alta concentración en ion potasio, denominado endolinfa. Cada canal posee un engrosamiento llamado ampolla, en cuyo interior un tejido epitelial especializado contiene las células ciliadas encargadas de la transducción de señales.

Cuando se produce una aceleración angular, la endolinfa se mantiene estacionaria, y, por tanto, más atrasada con respecto a las paredes del conducto que gira, sin embargo, si se mantiene una velocidad constante tras la aceleración, la propia inercia del movimiento arrastra a la endolinfa, dejándose de producir la deformación de la cúpula, imprescindible para la activación de las células ciliadas. Es por ello que el canal semicircular responde a aceleración angular, pero no a la aceleración lineal. Los órganos otolíticos del aparato vestibular, sáculo y utrículo, detectan aceleración lineal, como la gravedad o traslaciones de la cabeza, pero no la aceleración angular, produciendo movimientos parcialmente compensatorios (Fernández y col., 1972). Podríamos referirnos más correctamente pues a: reflejo canal-ocular y otolito-ocular.

Los tres canales se disponen aproximadamente ortogonales entre sí, con el horizontal aproximadamente en el plano del suelo. Los dos miembros de un par coplanar (e.g., canal

horizontal izquierdo - canal horizontal derecho) responderán máximamente a rotaciones en su plano común, pero la respuesta será opuesta (McCrea y col., 1980).

Los movimientos oculares del reflejo vestibulo-ocular tienen dos fases que en su conjunto se denominan nistagmo vestibular, que se lustran en la figura 1C: i) fase lenta, con movimientos oculares de igual velocidad, pero en sentido opuesto, al movimiento de la cabeza, cuyo estímulo específico es la aceleración angular detectada por las células sensoriales de los canales semicirculares y que constituye el movimiento compensatorio de los ojos respecto al de la cabeza (Goldberg y Fernández, 1971); y ii) fases rápidas, con movimientos oculares en el sentido del movimiento de la cabeza cuyo objeto es devolver el ojo a una posición central cuando se encuentra excéntrico en la órbita debido al movimiento lento compensatorio, y cuyas características dinámicas los hacen ser similares a los movimientos sacádicos espontáneos, con generación en lugares comunes a éstos (Hikosaka y Kawasmi, 1977; Igusa y col., 1980; Ohki y col., 1988).

Para el caso de las neuronas del NMOE, la principal entrada responsable de su disparo durante movimientos vestibulares corresponde al núcleo vestibular medial (VM), que proyecta excitatoriamente desde el lado contralateral e inhibitoriamente desde el lado homolateral (Escudero y Delgado-García, 1988).

Reflejo optocinético

Este reflejo genera movimientos oculares compensatorios cuando el campo visual se desplaza en ausencia de movimiento de la cabeza. Su objeto, al igual que el del resto de movimientos oculares, es el de mantener la imagen estable sobre la retina para una correcta visión.

El estímulo desencadenante es el error retinal producido por el desplazamiento de la imagen sobre la retina detectado por las células ganglionares de campo grande. El procesamiento por parte de estas células tras el comienzo del movimiento es de aproximadamente 55 ms (Collewijn, 1972), mientras que la latencia entre el inicio del estímulo y el movimiento de los ojos es de 100-130 ms (Collewijn, 1981). Debido al tiempo de procesamiento retinal es presumible entender que el reflejo optocinético funcione mejor a baja frecuencia de estímulo y errores retinales de baja amplitud.

Una vez comienza el estímulo visual se genera un movimiento ocular lento en la misma dirección denominado componente directo del movimiento ocular compensatorio, tras esta primera fase, la velocidad ocular va en aumento hasta alcanzar una velocidad de

equilibrio similar a la del estímulo (Cohen y col., 1977; Boyle y col., 1985). Durante esta fase lenta compensatoria, cuando el ojo se encuentra en una posición excéntrica dentro de su órbita, un movimiento rápido de naturaleza sacádica lo devuelve a una posición más central.

Al igual que en el reflejo vestibulo-ocular se pueden observar pues dos fases en el movimiento ocular: una lenta y compensatoria, y otra rápida de recentralización del globo ocular. Es lo que se denomina nistagmo optocinético. Al contrario que el reflejo vestibulo-ocular, sería un sistema de control cerrado, ya que existe una retroalimentación sensorial que corrige al movimiento ocular con el fin de minimizar el error retinal, y es debido a ese tiempo de retroalimentación que el reflejo optocinético perdería agudeza a frecuencias de estimulación altas (Collewijn, 1981).

Para la generación de la fase lenta, la información desde las células ganglionares se proyecta hasta los núcleos del sistema óptico accesorio (Giolli y col., 2006) y el complejo nuclear pretectal (Simpson y col., 1988) que a su vez reciben información visual procedente de la corteza (Distler y col., 2002). Estos núcleos proyectan a núcleos pontinos, núcleo reticular tegmental pontino, oliva inferior, núcleo *prepositus hypoglossi*, y núcleo vestibular medial (Mustari y col., 1994). Las neuronas de los núcleos pontinos y la oliva inferior dirigen aferencias al flóculo del cerebelo, que a su vez proyecta sobre los núcleos vestibulares (Distler y col., 2002; Ono y col., 2005). Finalmente, las neuronas vestibulares y del núcleo *prepositus hypoglossi* llevan información directa hasta las motoneuronas del sistema oculomotor. Las fases rápidas durante el reflejo optocinético son producidas por las mismas neuronas de brote a nivel de la formación reticular del tronco del encéfalo que generan los movimientos sacádicos (véase apartados 1.1.2 y 1.2.3).

1.1.2. Movimientos de desplazamiento de la mirada

Este tipo de movimientos tiene como objetivo ubicar en la retina ciertos objetivos diana, o bien seguir a aquellos que ya están ubicados, pero se mueven en el espacio visual. Dentro de este grupo se encuentran los movimientos oculares sacádicos, los de seguimiento y los de vergencia.

Movimientos sacádicos

Son movimientos rápidos de naturaleza balística que cambian bruscamente la dirección de la mirada. Su amplitud es variable dependiendo del contexto y pueden ser voluntarios o reflejos, como ocurre durante las fases rápidas del nistagmo vestibular y

optocinético, el seguimiento de un blanco visual, la exploración del campo visual y durante la fase REM del sueño (Figura 1A, C).

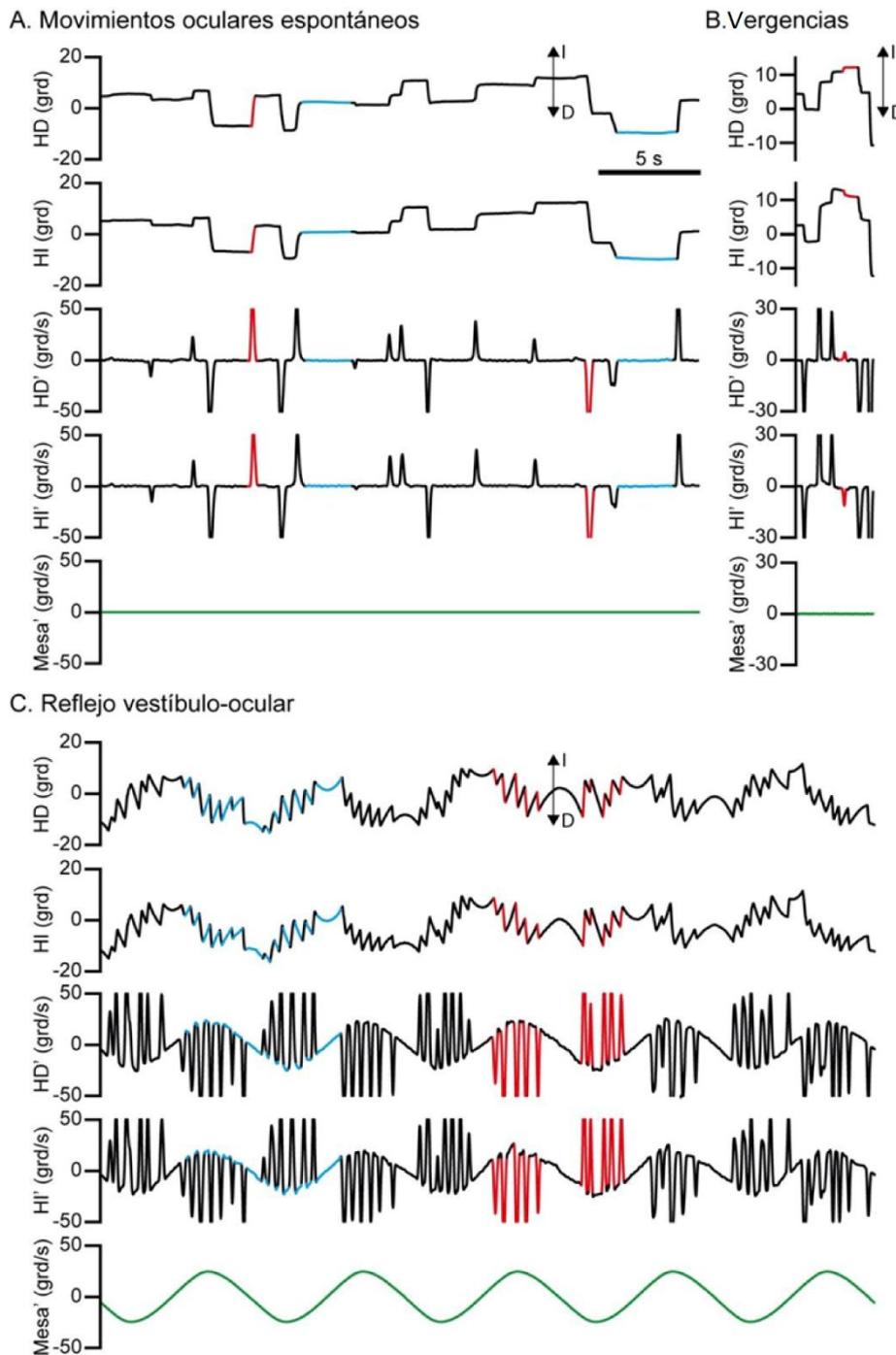


Figura 1. Movimientos oculares espontáneos y reflejo vestibulo-ocular en el plano horizontal. Para cada ejemplo de movimiento ocular se muestra consecutivamente: posición del ojo derecho e izquierdo (HD y HI, en grados), velocidad del ojo derecho e izquierdo (HD' y HI', en grados/segundo) y velocidad de la mesa (Mesa', en grados/segundo). Las flechas indican la dirección de los movimientos oculares, I para la izquierda y D para la derecha. En A y C, los trazos rojos resaltan movimientos oculares rápidos, o sacádicos, durante movimientos espontáneos, y la fase rápida del reflejo vestibulo-ocular; los trazos azules indican fijaciones durante movimientos espontáneos y la fase lenta del reflejo vestibulo-ocular. En B se muestra en rojo un movimiento de divergencia. Adaptado de la tesis doctoral de García Hernández, R., 2018.

Son movimientos muy frecuentes (1-3 Hz), con una latencia entre la aparición de un objeto de interés y el inicio del movimiento sacádico de aproximadamente 200 ms (Becker, 1989), de los cuales unos 55 ms se emplearían en el procesamiento retinal, y unos 25 ms en el circuito motor (Robinson, 1972), y el resto en el procesamiento central, durante el cual, conocida la posición del objetivo respecto a la retina, se calcularía la diferencia entre la posición inicial y final del ojo, que generaría la orden motora que activara los músculos extraoculares en la dirección y amplitud adecuadas.

El movimiento consta de una fase de aceleración seguida de otra de desaceleración con una duración de entre 15 y 100 ms entre el inicio y el final del movimiento, y una velocidad máxima de 600°/s (Becker, 1989). Ambos términos, duración y velocidad máxima, son dependientes de la amplitud del movimiento, y correlacionan directamente con ella, conformando la denominada ‘secuencia principal’ característica de cada individuo (Bahill y Stark, 1979; Harris y Wolpert, 2006).

Si durante la generación de un sacádico, el blanco visual cambia de posición, el sacádico pierde el blanco, y debe realizar un segundo sacádico para corregir el error. Sin embargo, frecuentemente, los movimientos sacádicos no alcanzan la posición del blanco, por lo que se debe producir un segundo movimiento de tipo ‘correctivo’ para lograrlo (Becker y Fuchs, 1969). Es por esto que se denominan movimientos de naturaleza balística, en los cuales el sistema se hace refractario a los posibles cambios de posición del blanco, es decir, una vez comienza el movimiento, no puede alterarse.

Respecto a la actividad electrofisiológica de las motoneuronas, la amplitud del movimiento correlaciona con la duración de la descarga de potenciales de acción que sirve para generar la fuerza suficiente que venza la resistencia natural del globo ocular al movimiento dentro de la órbita. Es lo que se denomina ‘pulso’, una señal fásica o de velocidad que precede a la fase post-sacádica, en la cual hay una fuerte caída de la velocidad y del disparo neuronal. Tras cada movimiento sacádico hay un nivel basal nuevo de descarga de la motoneurona que permite mantener la nueva posición ocular, en este caso la señal es tónica o de posición. Por tanto, la generación de los movimientos sacádicos se corresponden con un patrón de disparo tónico-fásico (Collins y col., 1975; Miller y Robins, 1992; Coubard, 2013).

Las neuronas premotoras que generan los movimientos sacádicos se encuentran en la formación reticular pontobulbar (Fuchs y col., 1985; Büttner-Ennever 1988; Escudero y

Delgado-García, 1988). Para los movimientos sacádicos en el plano horizontal, estas neuronas que generan la señal de velocidad se encuentran en la formación reticular paramediana pontina (FRPP) y en la formación reticular paramediana bulbar (FRPB) (Fuchs y col., 1985; Strassman y col., 1986a; Strassman y col., 1986b). En FRPP las neuronas son de brote excitador (NBEs) y hacen sinapsis excitadoras con las motoneuronas e interneuronas del NMOE homolateral, con lo que generarán movimientos sacádicos hacia el lado homolateral. En la FRPB las neuronas son de brote inhibitorio (NBIs) y hacen sinapsis inhibitorias con el NMOE contralateral inhibiendo al músculo recto lateral del otro lado. La señal de posición de las motoneuronas que permite la fijación del ojo tras el sacádico, o durante la fijación de la mirada, con tasas de disparo tónicas en función de la posición del ojo, se consigue por medio de ‘integradores neuronales’. Son células que integran matemáticamente la señal de velocidad en posición y que se encuentran en diversas estructuras, pero principalmente, para el plano horizontal, se encuentran en el núcleo *prepositus hypoglossi* (Escudero y Delgado-García, 1988; Delgado-García y col., 1989; Escudero y col., 1992).

Movimientos oculares de seguimiento

Son movimientos lentos de rastreo cuyo objeto es mantener un blanco que se mueve fijo sobre la retina frente a un fondo visual estacionario, y aunque se consideran diferentes a los movimientos sacádicos, ambos comparten estructuras a nivel cortical y subcortical (Krauzlis, 2005).

Se dan en animales con fovea, o estructura equivalente, y visión frontal (Büttner y Kremmyda, 2007), y aunque se puede elegir el objeto a seguir, no es posible decidir si se ejecuta el movimiento o no, siendo por tanto un movimiento con cierto grado de involuntariedad y automatismo, cosa que parece corroborarse debido a la baja latencia entre la aparición del blanco y el comienzo del movimiento ocular, de unos 0.13 s en el humano (Robinson, 1965; Lisberger y col., 1987). Se considera un movimiento lento que, en el gato, carente propiamente de fovea, pero dotado de un área central, se produce de hasta 20 grados/s (Robinson, 1981).

El estímulo que lo desencadena es el error retinal que produce el movimiento de la imagen sobre la retina y su mantenimiento se debe a señales de velocidad (Morris y Lisberger, 1987). Es un sistema que funciona a modo de lazo cerrado debido a la retroalimentación visual y motora.

Movimientos de vergencia

Son aquellos que alinean la retina de cada ojo con dianas visuales situadas a cierta distancia (i.e., más cerca o más lejos). Al contrario que el resto de los movimientos oculares, que son conjugados (i.e., ambos ojos se mueven en la misma dirección y amplitud), los movimientos de vergencia son disconjugados, o disyuntivos, pudiendo ser divergentes o convergentes, en los que los músculos efectores son el recto lateral y el recto medial, respectivamente. Aparecen con la frontalización de la mirada, y el consiguiente solapamiento del campo visual de ambos ojos, que junto al proceso de fovealización, dieron lugar a la binocularidad que permite la percepción de la profundidad. La percepción de la profundidad ocurre debido a las disparidades retinales que ocurren en cada ojo al percibir objetos a diferentes profundidades. Son movimientos lentos y de pequeña amplitud (Figura 1B, trazo rojo), y su generación a nivel neural es menos conocida.

Además, durante la convergencia ocurren otras dos respuestas visuales reflejas a parte del movimiento de los ojos cuando un objeto se encuentra cercano, estas son: la acomodación del cristalino, que por el incremento de su curvatura lleva el objeto a foco, y la constricción pupilar, que por reducción de la aberración esférica aumenta la profundidad de campo y hace la imagen más nítida. En su conjunto forman la denominada triada refleja cercana.

1.2. Estructura anatómica del sistema oculomotor

1.2.1. Músculos extraoculares

Anatomía

Los músculos extraoculares que rodean al ojo, y que permiten su movimiento en los tres planos del espacio (i.e., horizontal, vertical y antero-posterior), son tres pares de músculos, de los cuales cuatro son rectos y dos oblicuos (Spencer y Porter, 2006). Se disponen formando pares antagonistas (i.e., un músculo se contrae mientras su pareja se relaja) de la siguiente manera: i) recto lateral o externo – recto medial o interno, insertos en la porción temporal y nasal, respectivamente, del globo ocular y responsables de los movimientos de abducción y aducción, respectivamente, del ojo en el plano horizontal sobre el eje vertical; ii) recto superior – recto inferior, se insertan en la zona superior e inferior del ojo y producen su movimiento sobre el eje horizontal, generando, principalmente, movimientos de elevación y depresión, respectivamente, aunque también tienen funciones

secundarias y terciarias; y iii) oblicuo superior – oblicuo inferior, fijados en la porción externa superior e inferior, respectivamente, de la mitad posterior del globo ocular, producen movimientos en el eje antero-posterior dando lugar principalmente a intorsión (rotación hacia el plano nasal), y extorsión (rotación hacia el plano temporal), respectivamente (Figura 2A).

Los seis músculos se insertan sobre la esclera. Los cuatro músculos rectos lo hacen anteriormente al ecuador del globo ocular, mientras que los dos oblicuos lo hacen posteriormente en animales con visión frontal, y anterolateral en animales con visión lateral (Kono y col., 2005). El músculo oblicuo superior gira alrededor de una apófisis situada en la parte anterosuperior del hueso frontal (la tróclea), que se usa como punto de apoyo, y tras girar sobre ella regresa hasta insertarse posterior al ecuador del globo ocular.

Existen otros dos músculos extraoculares secundarios que no aparecen en todos los vertebrados. Son el músculo elevador del párpado superior, que puede producir indirectamente elevaciones del globo ocular, y el músculo retractor del globo ocular o *retractor bulbi*, asociado a la presencia de la membrana nictitante y al reflejo de retracción del globo ocular ante un estímulo corneal. Este último, presente en el gato, está formado por cuatro fascículos musculares que se insertan próximos al ecuador de la parte posterior del globo entrecruzándose con los cuatro músculos rectos.

Todos estos músculos extraoculares son extrínsecos al globo ocular y se originan en el anillo tendinoso de Zinn, excepto el músculo oblicuo inferior que se origina en la cara orbitaria del hueso maxilar (Sevel, 1986).

Los nervios de los pares craneales III, IV y VI, cuyos somas motoneuronales se encuentran en los núcleos NMOC, troclear y NMOE, respectivamente, constituyen la inervación motora de los músculos extraoculares. Los músculos recto medial, recto inferior y oblicuo inferior homolaterales, y músculos recto superior y elevador del párpado contralaterales, están inervados por el III par craneal o nervio oculomotor, además de 3 de los 4 músculos del *retractor bulbi*. El IV par craneal, o nervio troclear, inerva al músculo oblicuo superior contralateral, y el VI par craneal, o nervio abducens, a los músculos recto lateral y *retractor bulbi* homolaterales.

Anatómicamente, estos músculos (rectos y oblicuos) están formados por dos capas de tejido diferenciadas (Spencer y Porter, 2006): i) capa orbital, es la parte más externa, adyacente al hueso orbital; y ii) capa global, es la parte interna del músculo, cercana al globo

ocular. En algunas especies puede haber una fina capa de fibras musculares en la parte más externa del músculo, llamada capa marginal (Wasicky y col., 2000), e incluso una capa intermedia entre las capas global y orbital, formada por fibras procedentes de ambas capas. En los músculos rectos, la capa orbital tiene forma de C y discurre junto a la capa global, finalizando antes de la zona tendinosa de unión al globo ocular debido a su inserción en el tejido conectivo de la órbita, un tejido especializado denominado cápsula de Tenon, mientras que la capa global se inserta en el tendón muscular (Demer y col., 2000). Está formada por fibras de pequeño diámetro y tiene un sistema oxidativo y vascular más desarrollado que la capa global, permitiendo una mayor resistencia a la fatiga y una mayor activación continua. Ambas capas son bastante diferentes en su morfología y expresión genética.

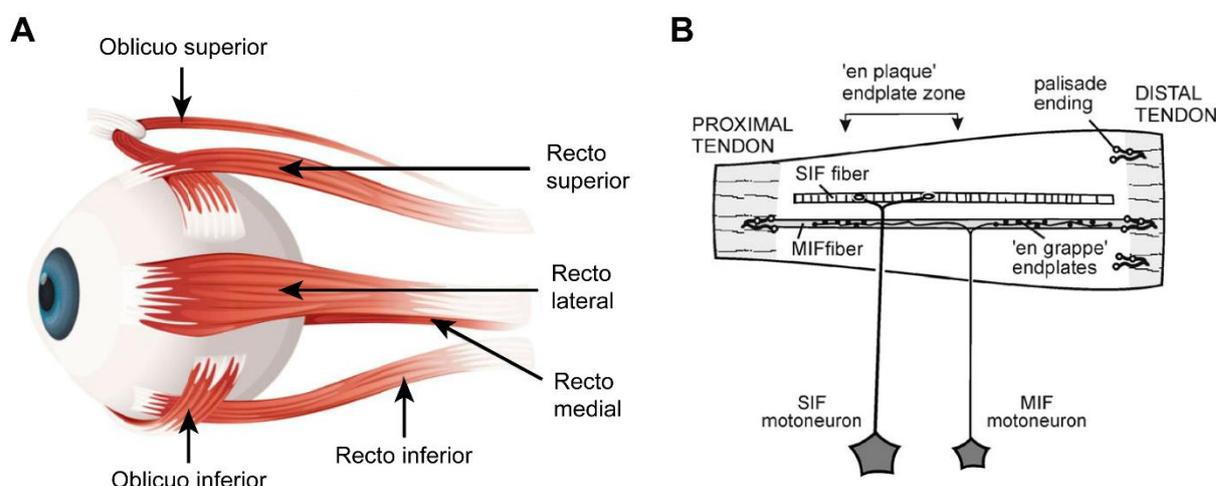


Figura 2. Músculos extraoculares y tipos de innervación. A: visión lateral de los músculos extraoculares que participan en los movimientos del ojo. Se organizan en tres pares antagonistas cuya contracción y relajación coordinada permite la correcta ejecución de un movimiento ocular determinado. B: esquema de un músculo extraocular donde se muestran los dos tipos principales de fibras que lo conforman (MIF y SIF fiber), y su innervación por parte de las motoneuronas oculomotoras ('MIF' motoneuron y 'SIF' motoneuron). Se pueden observar las uniones neuromusculares 'en plaque' del tercio central de las fibras SIF, así como las uniones de tipo 'en grappe' a lo largo de la fibra MIF. En la zona de inserción de la fibra MIF en el tendón se

Fibras de los músculos extraoculares

En un principio se describió que los músculos extraoculares contenían dos tipos básicos de fibras musculares, un tipo sería similar a la típica fibra de contracción rápida de los músculos esqueléticos de mamíferos, y el otro, similar a las fibras lentas consideradas atípicas. Actualmente estas fibras se clasifican, principalmente, por su patrón de inervación por parte de la motoneurona, denominándose fibras mono-inervadas ('singly innervated muscle fiber' o SIF) y fibras multi-inervadas ('multiply innervated muscle fiber' o MIF), (Büttner-Ennever y col., 2001; Büttner-Ennever, 2006).

Las fibras SIF son más frecuentes y están inervadas por axones de gran diámetro que forman uniones neuromusculares *en plaque* en el tercio central del músculo, similares a las de los músculos esqueléticos; en el caso de las fibras MIF, los axones son de menor diámetro y van dejando a lo largo de la fibra múltiples contactos sinápticos de pequeño tamaño, formando uniones musculares *en grappe* (Figura 2B; Hess y Pilar, 1963)

Otro aspecto peculiar de la musculatura extraocular y su inervación se refiere al tamaño de las unidades motoras. Así, a diferencia de los músculos esqueléticos, donde las unidades motoras son de gran tamaño, en el sistema oculomotor las unidades motoras se caracterizan porque cada motoneurona inerva un número pequeño de fibras musculares (e.g., diez fibras musculares por motoneurona), lo que permite incrementos de fuerza muy precisos necesarios para el correcto movimiento de ojos (Spencer y Porter, 2006).

Se pueden describir 6 tipos de fibras si, además de la clasificación a partir del patrón de inervación (MIF y SIF), se tiene en cuenta la capa en la que se distribuyen (orbital y global) y su contenido mitocondrial (rojas, intermedias y blancas). Dos de los seis tipos de fibras se encuentran en la capa orbital (una SIF y una MIF) y cuatro en la capa global (tres SIFs y una MIF). Cada tipo de fibra se diferencia, no solo por su disposición en el músculo y su inervación, sino que cada una está caracterizada por la cantidad de retículo sarcoplásmico, número y tamaño de mitocondrias, nivel de actividad enzimática oxidativa y glicolítica, y extensión del sistema de túbulos T. A grandes rasgos, las fibras MIF tienen menor contenido mitocondrial y enzimático, por lo que su contracción es lenta y presentan una alta resistencia a la fatiga, al contrario que las fibras SIF, cuya contracción es rápida y son relativamente fatigables (Porter y col., 1995; Spencer y Porter, 2006; Zimmermann y col., 2013; Bohlen y col., 2017a y b), rasgos que, junto a su mayor presencia en ambas capas

del músculo, explican la alta velocidad a la que pueden generar movimientos (Shall y Goldberg, 1992).

Propiocepción

El movimiento coordinado de los ojos es esencial para una correcta visión, y para ello, es necesario que a nivel central se tenga información acerca de la posición ocular en cada momento para que se dé un correcto control de los movimientos oculares. Si los ojos permanecieran estáticos en su órbita, la información visual a través de la retina constituiría la retroalimentación necesaria para esta función. Sin embargo, los ojos y el mundo visual están en constante movimiento, por lo cual, es necesaria una información no visual, o no retiniana, que informe al sistema nervioso de la posición ocular. Durante muchos años, se aceptó que esta señal extra-retinal provenía desde el sistema nervioso central, teoría planteada en un principio

por Helmholtz en su concepto ‘innervational sense’ (1866), y que más tarde se conocería como ‘copia eferente’ o ‘descarga corolaria’ (Sperry, 1950). De manera opuesta a esta teoría se encuentran los trabajos de Sherrington, quien introdujo en 1906 el término ‘propiocepción’ como ‘un reflejo del sistema para el mantenimiento de la posición corporal y la coordinación del movimiento que permite la conciencia de la posición del cuerpo’. Más tarde atribuiría la percepción de la posición y el movimiento a un sentido proveniente del músculo, el cual se hallaría también en los músculos extraoculares (Sherrington, 1918; Ruskell, 1999). Estos términos, copia eferente y propiocepción, se conocen, respectivamente, como mecanismos de salida (‘outflow’) y entrada (‘inflow’) de la información.

Actualmente se acepta que existe una señal aferente no visual que informa al sistema nervioso central de la posición del ojo y que proviene principalmente de los propioceptores de los músculos extraoculares, los cuales tienen presencia variable según la especie, si bien la cuestión de la propiocepción oculomotora sigue siendo incierta.

- Huso muscular o neuromuscular

Es un órgano sensorial cuya función es detectar la longitud del músculo y tiene un papel importante en el control de la contracción (Hunt, 1990). Es fusiforme y está compuesto por pequeñas fibras musculares intrafusales especializadas, con inervación motora y sensorial, y encapsulado por una capa de perineuro y fibroblastos aplanados. Está presente en la musculatura esquelética de todas las especies y en la musculatura extraocular de

humanos, algunas especies de monos, ratones y ungulados (Mahran y Sakla, 1965; Blumer y col., 2003).

En los músculos extraoculares de humanos se encuentran en gran número (Lukas y col., 1994) y siempre están asociados a la capa orbital y transicional del músculo (Harker, 1972; Ruskell, 1989; Lukas y col., 1994; Blumer, 1999), aunque sus diferencias anatómicas respecto a los de los músculos esqueléticos, excepto en ungulados (Harker, 1972), han puesto en duda su funcionalidad en los músculos extraoculares (Ruskell, 1989, 1999). En el gato están ausentes, así como en la mayoría de las especies de mono, conejo, perro y rata (Maier y col., 1974).

- Órgano tendinoso de Golgi

Es un receptor de forma fusiforme encapsulado en una fina capa perineural que contiene colágeno, y tiene varias fibras musculares unidas a un polo, en concreto fibras MIF (Blumer y col., 2006). Funciona como un transductor de fuerza, y constituye una aferencia para la regulación refleja del comportamiento motor (Ruskell, 1999). Se han encontrado en tendones de músculos extraoculares de varias especies, como la oveja, el cerdo, el camello y, de manera poco frecuente, en monos (Ruskell, 1979; Ruskell, 1990; Blumer y col., 2000). Dentro de los músculos extraoculares presentan una gran variabilidad y difieren en su estructura de aquellos de la musculatura esquelética (Ruskell, 1990; Blumer y col., 2006).

- Terminaciones nerviosas en empalizada

A diferencia de los receptores de músculos extraoculares previamente descritos, los cuales solo se encuentran en un número limitado de especies animales y, en general, no se encuentran tan desarrollados como los propioceptores de los músculos esqueléticos, las terminaciones en empalizada ('palisade endings') se han encontrado en los músculos extraoculares de la mayoría de los mamíferos (Huber, 1900; Ruskell, 1978; Alvarado-Mallart y PinÇon-Raymond, 1979; Richmond y col., 1984; Sodi y col., 1988; Blumer y col., 2016). Algunos autores han sugerido que este tipo de terminación en empalizada podría constituir el órgano propioceptor de los músculos extraoculares análogo al de los músculos esqueléticos (Billig y col., 1997), aunque hallazgos recientes indican que podrían ser de naturaleza motora (Zimmermann y col., 2011, 2013; Blumer y col., 2016, 2017).

Tienen una estructura similar a la de los órganos tendinosos de Golgi (Lukas y col., 2000), y, de hecho, ciertos estudios durante el desarrollo embrionario y postnatal sugieren que podrían ser órganos tendinosos de Golgi inmaduros (Zelena y Soukup, 1977). Son

terminaciones de axones que se encuentran, específicamente, en la unión miotendinosa de los músculos extraoculares y en algunos casos presentan ramificaciones colaterales en el tendón cercano (Alvarado-Mallart y PinÇon-Raymond, 1979); estas peculiaridades, junto a su naturaleza membranosa (similar a la de otros órganos propioceptores), parecen indicar la hipótesis de su función sensorial (Billig y col., 1997).

Los axones de estos receptores vienen desde el músculo, entran en el tendón y después giran 180 grados para formar varicosidades alrededor del extremo final de una sola fibra muscular de tipo MIF perteneciente a la cara global del músculo, fibra en la cual, el axón, habrá establecido previamente y en todo su recorrido, varios contactos sinápticos motores *en grappe*. Además, hay estudios que han demostrado que las terminaciones en empalizada de gatos y monos son colinérgicas y provienen de las motoneuronas MIF de los núcleos oculomotores; aunque otros autores sugieren que podrían venir de posibles poblaciones de células sensoriales alojadas en estos núcleos (Konakci y col., 2005; Lienbacher y col., 2011a, b). Si este tipo de terminaciones tiene función sensorial, motora, o mixta, sigue siendo una cuestión abierta dentro del campo oculomotor

1.2.2. Núcleos oculomotores

Estos núcleos, por orden de localización rostral-caudal, son: NMOC, el núcleo troclear y NMOE (también llamado núcleo abducens). En ellos se encuentran los cuerpos celulares de las motoneuronas que inervan los músculos extraoculares y los de las neuronas internucleares, o interneuronas, que proyectan hacia otros núcleos implicados en los movimientos oculares. Establecen un circuito neuronal que, junto a la inervación de los músculos extraoculares, conforma un sistema muy conservado evolutivamente en el cual solo se han encontrado variaciones del patrón de inervación en especies de elasmobranquios (Graf y Brunken, 1984).

Electrofisiológicamente, ambos tipos celulares, motoneuronas e interneuronas, tienen un patrón de disparo tónico-fásico similar. El componente fásico es un brote de potenciales de acción de alta frecuencia que ocurre antes del comienzo de un movimiento sacádico en la dirección de activación (dirección ‘on’), así como una disminución brusca o cese de la actividad de disparo antes del movimiento de inactivación (dirección ‘off’), y provee al músculo de la fuerza de contracción necesaria para vencer la resistencia debida a la elasticidad y viscosidad del globo ocular en su órbita, para alcanzar así una nueva posición.

La duración del brote, el cual puede llegar a superar las 500 espigas/segundo en la frecuencia pico, es proporcional a la amplitud del sacádico, y de la pendiente obtenida de la relación entre la frecuencia de disparo del brote (con el componente de posición sustraído) y la velocidad del ojo durante el sacádico se obtiene la medida de sensibilidad de la motoneurona a la velocidad del ojo, conocida como 'r' y expresada en espigas/segundo/grados/segundo. El componente tónico produce la tensión constante del músculo, necesaria para vencer el componente elástico del ojo y mantener la posición ocular durante una fijación. Para posiciones oculares más extremas en la dirección de activación, se necesitará más fuerza, y, por tanto, mayor frecuencia de disparo por parte de la motoneurona, que además será mayor si la posición ocular viene de la dirección de activación. La motoneurona puede llegar a frecuencias de disparo de 200 espigas/segundo durante fijaciones. De la relación entre la frecuencia de disparo y la posición ocular se obtiene el parámetro 'k', que corresponde a la pendiente de la recta de regresión frecuencia-posición, y se denomina sensibilidad de la motoneurona a la posición ocular (durante fijaciones), cuyas unidades son espigas/segundo/grado. De esta recta de regresión también se obtiene el umbral de reclutamiento (T_h), que es la posición ocular (en grados) en la cual la motoneurona es reclutada en actividad, y se calcula como la intersección de esta recta con el eje x (i.e., posición ocular). En el caso de las interneuronas, k y r son mayores, tienen umbrales de reclutamiento menores y su disparo es más irregular (Delgado-García y col., 1986a y b).

En cada núcleo oculomotor podemos diferenciar dos tipos de motoneuronas: las que inervan fibras musculares tipo SIF, que se conocen como motoneuronas SIF, y las que inervan fibras MIF, denominadas motoneuronas MIF (Büttner-Ennever, 2001). Ambos tipos de motoneuronas difieren en su morfología, electrofisiología, propiedades histoquímicas, aferencias y localización en el núcleo dependiendo de la especie (Büttner-Ennever y col., 2002; Büttner-Ennever, 2006; Eberhorn y col., 2005; Hernández y col., 2019).

Núcleo motor ocular común

Se localiza en la formación reticular mesencefálica del tronco del encéfalo, a nivel de los tubérculos cuadrigéminos superiores, y está limitado dorsalmente por el acueducto de Silvio y la sustancia gris periacueductal, y ventralmente por el fascículo longitudinal medial; su porción más rostral llega hasta el límite anterior del mesencéfalo, y caudalmente se extiende hasta el núcleo troclear, con el cual se fusiona en algunas especies.

Los axones de sus motoneuronas proyectan a través del tercer par craneal, el mayor de los nervios oculomotores, inervando al músculo recto superior contralateral, y de forma

homolateral a los músculos recto inferior, recto medial y oblicuo inferior, y en mamíferos, adicionalmente, existe un subgrupo dorsal de motoneuronas, denominado núcleo caudal

central, que inerva al músculo elevador del párpado (Büttner-Ennever, 2006). Estas motoneuronas se agrupan en poblaciones anatómicamente segregadas en función del músculo inervado (Naito y col., 1974; Akagi, 1978; Glicksman, 1980; Miyazaki, 1985; Murphy y col., 1986; Büttner-Ennever y col., 2001), y su localización topográfica dentro del NMOC varía según la especie, dependiendo de su secuencia de desarrollo neuronal y muscular. Sin embargo, en algunas especies de mamíferos, como el mono (Büttner-Ennever, 2001) y el gato (Miyazaki, 1985), la localización sigue un patrón muy similar, con el siguiente esquema en sentido rostro-caudal: la población que inerva al recto inferior, seguida de la del recto medial, oblicuo inferior y recto superior (Shaw y Alley, 1981).

También en este núcleo se encuentran, entremezcladas entre las motoneuronas y en los bordes del mismo (de la Cruz y col., 1998), las neuronas internucleares del NMOC que proyectan, entre otras estructuras, hacia el NMOE (de la Cruz y col., 1992; Büttner-Ennever y col., 2003), cerebelo y médula espinal; así como una población de neuronas preganglionares parasimpáticas (núcleo Edinger-Westphal) que inervan al ganglio ciliar homolateral, y que son responsables de la constricción de la pupila y acomodación del cristalino.

Núcleo troclear

También llamado núcleo patético, se encuentra a nivel de los tubérculos cuadrigéminos inferiores, caudal al NMOC y ventral al acueducto de Silvio. Los axones de sus motoneuronas constituyen el cuarto par craneal, el menor de los nervios oculomotores y el único que sale desde la zona dorsal del tronco del encéfalo. La gran mayoría de estos axones inerva al músculo oblicuo superior contralateral, y en menor número al oblicuo superior homolateral (Miyazaki, 1985; Murphy y col., 1986). También contiene motoneuronas que inervan al músculo tensor del tímpano homolateral (Shaw y Baker, 1983).

Núcleo motor ocular externo

Se encuentra a la altura de la formación reticular pontina del tronco del encéfalo en una posición dorsal, bajo el suelo del cuarto ventrículo e inmediatamente ventral a la rodilla del nervio facial.

Los axones de sus motoneuronas proyectan a través del sexto par craneal innervando el músculo recto lateral homolateral. Este nervio también contiene los axones que innervan el músculo *retractor bulbi* homolateral (en anfibios y mamíferos) a partir de motoneuronas localizadas en el núcleo motor ocular accesorio, un pequeño núcleo situado ventrolateralmente al NMOE (Spencer y Porter, 1981; Barbas-Henry y Lohman, 1988).

El NMOE está formado por motoneuronas y neuronas internucleares en una proporción de 2:1, respectivamente. Ambos tipos presentan rangos de tamaños similares, siendo la media de las motoneuronas ligeramente mayor, y se encuentran igualmente distribuidas por el núcleo independientemente del tamaño (Delgado-García y col., 1986b). Los axones de las interneuronas atraviesan la línea media a nivel del núcleo y cursan a través del fascículo longitudinal medial, estableciendo sinapsis excitadoras con las motoneuronas del recto medial en el NMOC contralateral (Highstein y Baker, 1978; McCrea y col., 1986). Las interneuronas internucleares del NMOE juegan un papel fundamental en la generación de los movimientos conjugados en el plano horizontal (Delgado-García y col., 1986b).

1.2.3. Aferencias al NMOE

Las entradas aferentes al NMOE son comunes a las motoneuronas e interneuronas de este núcleo. Las aferencias desde áreas premotoras constituyen un sistema de conexiones recíprocas responsable de la generación de los diferentes tipos de movimientos oculares. A continuación, se indican las tres principales aferencias al NMOE, núcleo objeto del presente estudio:

1) Núcleos vestibulares: forman un complejo formado por los núcleos superior (Bechterew), lateral (Deiters), inferior y medial. Están localizados en la protuberancia del tronco del encéfalo, laterales al NMOE, y son las neuronas de segundo orden del llamado arco trineuronal del reflejo vestíbulo-ocular (Lorente de Nó, 1933). Reciben entradas desde las fibras aferentes primarias del aparato vestibular, cuyos cuerpos celulares se encuentran en el ganglio de Scarpa, y llegan a las neuronas de segundo orden a través del octavo par craneal.

Las aferencias primarias de los canales semicirculares horizontales tienen una tasa de disparo constante en ausencia de estímulo (Blanks y col., 1975), y responden de manera proporcional a la velocidad de la cabeza, aumentando la tasa de disparo cuando el movimiento es homolateral y disminuyéndola cuando es contralateral (Löwestein y Sand,

1940). Estas fibras contactan monosinápticamente con las neuronas vestibulares del núcleo medial y ventrolateral (McCrea y col., 1987), desde las cuales la información llegará monosinápticamente a las motoneuronas e interneuronas del NMOE, desde el núcleo medial, y a las motoneuronas del recto medial en el NMOC, desde el núcleo ventrolateral; estas últimas motoneuronas también reciben información vestibular a través de las interneuronas del NMOE (Highstein y Baker, 1978). Las neuronas vestibulares homolaterales al NMOE son inhibitorias y sus contactos sinápticos se localizan sobre la membrana del soma y las dendritas proximales de las motoneuronas del NMOE, mientras que las neuronas vestibulares contralaterales son excitadoras y contactan, sobre todo, con el árbol dendrítico (Destombes y Rouvière, 1981). Este circuito neuronal conecta de un modo excitador al canal horizontal con el recto interno homolateral y con el recto externo contralateral (Cohen y col., 1964), permitiendo el movimiento conjugado de los ojos en el plano horizontal cuando hay movimientos rotatorios de la cabeza.

Durante movimientos oculares espontáneos, las neuronas vestibulares aferentes al NMOE, presentan un patrón de disparo denominado de posición-pausa-velocidad, ya que tienen una señal de posición ocular débil, y durante movimientos rápidos presentan pausas en su actividad de disparo (Escudero y col., 1992).

El complejo de núcleos vestibulares mantiene conexiones intrínsecas y conexiones con el complejo vestibular contralateral, así como aferencias y eferencias con otros núcleos y estructuras implicadas en los movimientos oculares, como el núcleo *prepositus hypoglossi*, la formación reticular y el cerebelo (Carleton y Carpenter, 1983).

2) Formación reticular: existen dos áreas que proyectan sobre el NMOE, la FRPP y la FRPB.

La FRPPP se encuentra inmediatamente rostral al NMOE (Langer y col., 1986). Proyecta homolateralmente, y de forma excitadora, sobre la membrana somática de las motoneuronas del NMOE (Destombes y Rouvière, 1981; Langer y col., 1986). En ella encontramos dos tipos de células en función de su patrón de disparo: neuronas de brote excitador (NBE) y neuronas retículo-espinales. Las NBE producen un brote de potenciales de acción cuando se produce un movimiento sacádico, o una fase rápida de algún reflejo, en dirección homolateral, mientras que durante movimientos oculares lentos y fijaciones permanecen silentes (Escudero y Delgado-García, 1988). Las NBE proyectan homolateralmente y de forma excitadora sobre las neuronas del NMOE, y también proyectan homolateralmente sobre los núcleos vestibulares y el núcleo *prepositus hypoglossi*. Las

neuronas retículo-espinales proyectan principalmente al tronco del encéfalo, y escasamente al NMOE. Tienen entradas monosinápticas desde los tubérculos cuadrigéminos superiores y en su patrón de disparo integra movimientos simultáneos de ojo y cabeza (Grantyn y Berthoz, 1987).

La FRPB tiene neuronas de brote inhibidor (NBI) que proyectan de forma inhibidora sobre el soma de las motoneuronas del NMOE contralateral. Producen brotes de potenciales de acción cuando se producen movimientos sacádicos y fases rápidas en dirección contralateral (en relación al NMOE), y disminuyen la tasa de disparo de las motoneuronas del NMOE dado que sinaptan inhibitoriamente (Escudero y Delgado-García, 1988). Sus proyecciones también abarcan los núcleos vestibulares y el núcleo *prepositus hypoglossi* (Strassman y col., 1986b).

3) Núcleo *prepositus hypoglossi*: en este núcleo se encuentran neuronas implicadas en el control de los movimientos oculares que proyectan hacia los núcleos oculomotores, hacia el NMOE lo hacen de forma bilateral, homolateralmente de forma excitadora y contralateralmente de forma inhibidora (McCrea y col., 1979; McCrea y Baker, 1985; Langer y col., 1986). Según su actividad electrofisiológica respecto a los movimientos oculares, la actividad de sus neuronas se puede clasificar como de ‘posición’, ‘velocidad-posición’ o ‘velocidad’ (Delgado-García y col., 1989), al NMOE proyectarían aquellas neuronas con señal de posición (Escudero y col. 1992).

Tiene conexiones entre sus propias células, con los núcleos vestibulares, la FRPP y la FRPB, cerebelo, tálamo y tubérculo cuadrigémico superior, entre otros (McCrea y Baker, 1985). Es por esta cantidad de información que recibe y procesa, y lo variado en el patrón de disparo de sus células, que es considerado un centro generador y distribuidor de una copia eferente (McCrea y Baker, 1985), así como un integrador neuronal que transforma la señal de velocidad de las neuronas de brote de la formación reticular y la de las neuronas vestibulares en señal de posición (Fuchs y col., 1985; Cannon y Robinson, 1987).

Por último, es importante subrayar que cada una de estas tres aferencias al NMOE sería mayormente responsable de las distintas señales presentes en las motoneuronas de dicho núcleo: i) las neuronas vestibulares son principalmente responsables de la señal presente en estas motoneuronas durante el reflejo vestibulo-ocular; ii) las neuronas de brote excitador e inhibidor generan la señal fásica presente en estas motoneuronas durante los sacádicos ‘on’ y ‘off’, respectivamente; y iii) las neuronas del núcleo *prepositus hypoglossi*

son principalmente responsables de la señal tónica presente en las motoneuronas del NMOE durante fijaciones oculares (Escudero y Delgado-García, 1988).

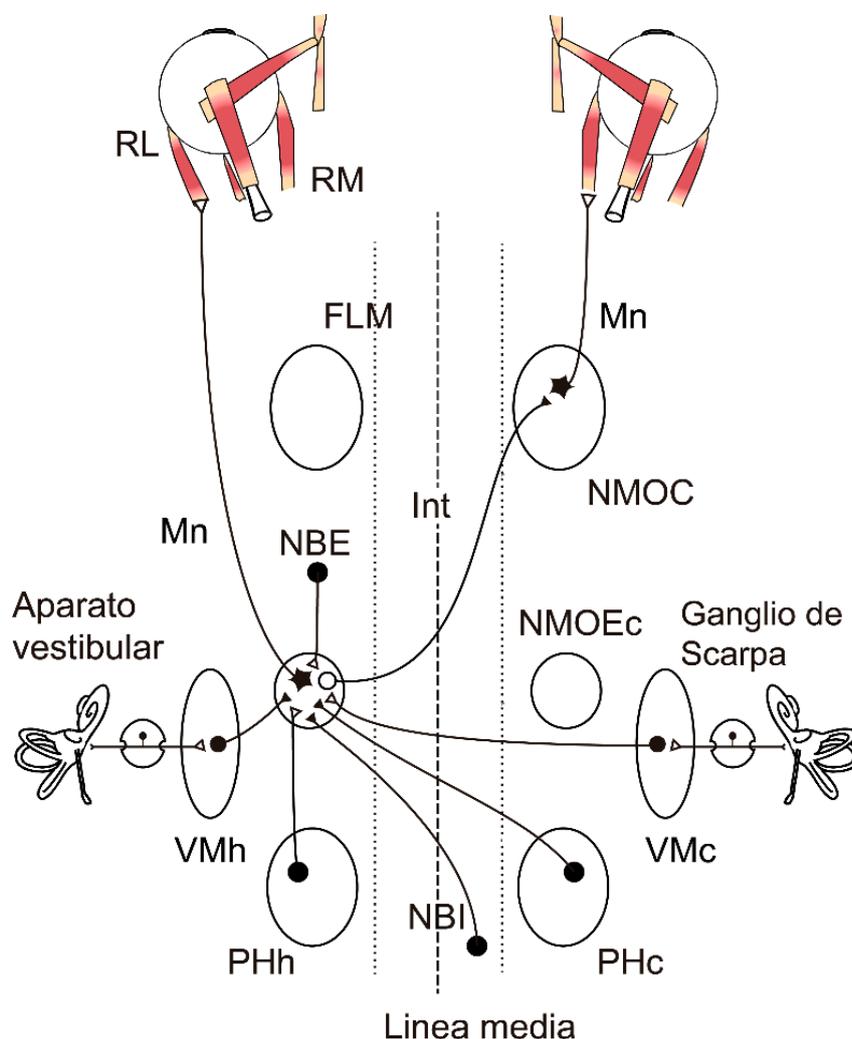


Figura 3. Circuito neuronal generador de movimientos oculares en el plano horizontal. Las principales aferencias del NMOE son las neuronas del núcleo *prepositus hypoglossi* (PH), neuronas reticulares de brote inhibitorio (NBI) y excitador (NBE), y neuronas del núcleo vestibular medial (VM). Las aferencias blancas son de tipo excitador, y las negras son inhibitorias. Las letras c y h indican contralateral y homolateral, respectivamente. La excitación de las motoneuronas (Mn) del NMOE produce la contracción del músculo recto lateral (RL) y a su vez, las motoneuronas del NMOE contralateral también se excitarán gracias a las interneuronas (Int) que conectan ambos núcleos a través del fascículo longitudinal medial (FLM). Esto hará que el músculo recto medial (RM) contralateral se contraiga, produciendo el movimiento coordinado de ambos ojos en el plano horizontal. Modificado de la tesis doctoral de González Forero, D., 2003.

1.2.4. Axotomía periférica del NMOE

El NMOE constituye un buen modelo en el que estudiar los cambios inducidos por distintos tipos de lesión, ya que se conoce bien el patrón de disparo de sus motoneuronas, así como las distintas entradas aferentes al núcleo y las señales que estas codifican.

Una lesión por axotomía produce cambios morfo- y electrofisiológicos en la propia célula lesionada que se deben tanto a la desconexión de su blanco de inervación (por lo que cesa el aporte de moléculas neurotróficas derivadas de la diana), como al propio proceso de lesión generado tras un daño.

Estos cambios comienzan de 24 a 72 horas tras la lesión y pueden ser revertidos si la neurona inerva de nuevo su diana original, o incluso un nuevo blanco (Benítez-Temiño y col., 2003), recuperando así su estado normal (Brännström y col., 1992). Esta capacidad regeneradora del sistema nervioso periférico no se observa en el sistema nervioso central, en el cual la lesión produce efectos nocivos permanentes, cuando no la muerte celular (Tetzlaff y col., 1994).

De forma generalizada, la axotomía periférica produce una reducción del árbol dendrítico (Brännström y col., 1992) y una reacción cromatolítica a nivel del soma que conlleva su redondeamiento, además de la hipertrofia del núcleo con desplazamiento periférico, disgregación del aparato de Golgi y dispersión de los gránulos de Nissl (Tetzlaff y col., 1994). Estos cambios morfológicos tras la axotomía no se han observado en las motoneuronas axotomizadas del NMOE (Baker y col., 1981; Delgado-García y col., 1988).

También se producen cambios metabólicos y de expresión génica dirigidos a la regeneración axonal, aumentando así la expresión de genes presentes durante el desarrollo, como GAP-43, factores de transcripción para proteínas estructurales, y aumento de la expresión de receptores de neurotrofinas, como p75 y TrkA y B (Agarwala y Kalil, 1998; Hammarberg y col., 2000). Metabólicamente aumentan las enzimas implicadas en el catabolismo y consumo de glucosa (Lieberman, 1971).

A nivel del soma y árbol dendrítico se produce una pérdida de contactos sinápticos aferentes, tanto en la axotomía central como periférica (Delgado-García y col., 1988; Pastor y col., 2000), y el axón sufre una degeneración Walleriana en su zona más distal, lo cual produce su fragmentación debido a la desorganización del citoesqueleto. Los macrófagos fagocitan los restos de la degeneración y en la zona proximal del axón se forma un cono de

crecimiento en el cual las células de Schwann proporcionan el medio celular y molecular apropiado para la regeneración (Ide y Kato, 1990).

En el caso de la axotomía de las motoneuronas del NMOE, se ha observado en registros extracelulares unitarios usando la preparación crónica del animal alerta, una disminución en la frecuencia de los potenciales de acción durante ambos componentes del disparo, tónico y fásico, con la consecuente bajada en los valores de k y r , así como conductas atípicas. Esta situación, al igual que la pérdida de las sinapsis aferentes (fenómeno conocido como 'synaptic stripping'), revierten cuando el axón reinerva al músculo (Baker y col., 1981; Delgado-García y col., 1988).

2. TEORÍA TRÓFICA DE LAS CONEXIONES NEURALES

Durante el desarrollo, los axones en crecimiento deben encontrar una estructura diana apropiada a la que inervar. En 1928, Ramón y Cajal propuso que podrían ser las propias células diana las que liberaran señales que atrajesen selectivamente a estos axones en crecimiento, y, además, que en el sistema nervioso no solo se daría esta quimioatracción, sino que también habría quimiorrepulsión para impedir que un axón inervase una estructura inapropiada (Ramón y Cajal, 1928). Sin embargo, debido a la pequeña cantidad de estos factores que producen las células diana, y a la incapacidad para distinguir entre moléculas trópicas (que guían los axones) y tróficas (que sostienen la supervivencia y el crecimiento de la neurona una vez alcanza su blanco), estos factores no pudieron ser descritos hasta décadas más tarde mediante técnicas de purificación bioquímica y análisis genético.

Los primeros experimentos, que más tarde darían lugar a la postulación de la teoría neurotrófica, fueron los desarrollados en el campo de la neuroembriología por Viktor Hamburger y Rita Levi-Montalcini. En un principio, se observó que, una semana después de extirparse un primordio de extremidad en el embrión de pollo, se producía una gran pérdida de las motoneuronas que lo inervaban; si, por el contrario, se implantaba un primordio de extremidad extra, el número de motoneuronas en la médula espinal del lado del implante era mayor que en el lado control, según se observó en una fase tardía embrionaria. En otros experimentos, en los que se realizaban implantes de tumores en ratones, se observó un crecimiento axonal exuberante dirigido hacia el tumor. De estos resultados se concluyó que debía haber alguna sustancia promotora de la supervivencia y el crecimiento de los axones. Finalmente se determinó que se trataba de una molécula de naturaleza proteica y se la llamó

factor de crecimiento nervioso ('nerve growth factor' o NGF) (ver revisión en Levi-Montalcini, 1982).

La teoría trófica de las conexiones neuronales, formulada años más tarde, pretende, pues, explicar esta dependencia de las neuronas respecto al blanco celular que inervan. De esta interacción, mediada por señales moleculares intercelulares, dependen la propia supervivencia de la neurona, el correcto desarrollo de la neurona inmadura, su posterior diferenciación y finalmente la adquisición de las propiedades electrofisiológicas y morfológicas del fenotipo adulto. Las moléculas que median estos procesos se denominan factores neurotróficos, son segregados por la célula diana y tienen sus efectos a través de la unión a los receptores específicos situados en la membrana presináptica de la aferencia neuronal.

Según Purves (1988) en su libro 'Body and Brain. A Trophic Theory of Neural Connections', la plasticidad de las neuronas que componen el sistema nervioso de vertebrados es mucho más lábil de lo que se había creído hasta entonces, de manera que los patrones de las conexiones neuronales están sujetos a una continua regulación química por interacciones con las células diana que contactan, regulación que se da de por vida (Figura 4).

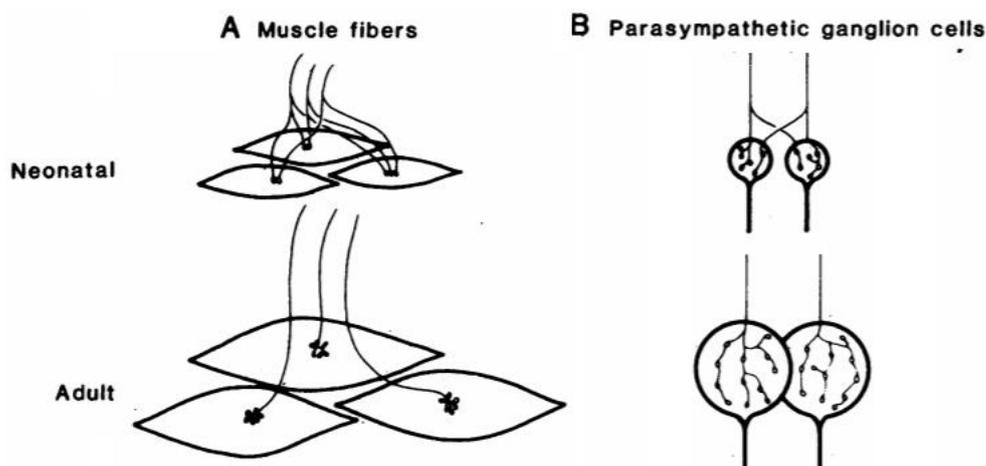


Figura 4. Diagrama del proceso de pérdida de sinapsis durante el desarrollo en (A) músculo esquelético y (B) ganglios parasimpáticos. La mayor parte de la inervación múltiple originada durante la etapa embrionaria se elimina durante el desarrollo postnatal, sin embargo, aumenta el tamaño y la complejidad de la arborización en cada célula diana madura. No hay una pérdida neta de sinapsis, sino la eliminación de contactos inmaduros y el crecimiento de la maquinaria sináptica de los axones que permanecen. Tomada de Purves y Lichtman, 1980.

Durante el desarrollo en vertebrados hay un mayor número de neuronas que en el estado adulto, la población final se establece por la apoptosis de aquellas neuronas que no reciben la cantidad suficiente de factores neurotróficos debido a un contacto inapropiado con el blanco. De esta forma, las neuronas tienen que competir por concentraciones limitantes de factores neurotróficos secretados por el tejido diana.

Estos factores neurotróficos no solo llegan a la neurona de forma retrógrada desde la célula diana, sino que además pueden ejercer su función por mecanismos autocrinos y/o paracrinos. En el primero es la propia neurona la que sintetiza los factores tróficos, y en el segundo, lo es una célula cercana a la neurona, como podrían ser células gliales u otras neuronas (Kokaia y col., 1993; Miranda y col., 1993; Davies, 1996). Incluso se ha descrito un mecanismo anterógrado de acción, a través del cual la neurona recibe los factores neurotróficos desde sus aferencias (von Bartheld y col., 1996; Conner y col., 1998).

Existe una gran variedad de familias de factores neurotróficos descritas, y cada una ejerce sus efectos a través de receptores diferentes y específicos, generando distintos procesos celulares. Se pueden clasificar en cuatro grupos: i) familia de las neurotrofinas (también llamada NGF-superfamilia), la más estudiada y a la que pertenecen, entre otros, el NGF, el factor neurotrófico derivado del cerebro ('Brain Derived Neurotrophic Factor' o BDNF), la neurotrofina 3 (NT-3) y la neurotrofina 4/5 (NT-4/5); ii) superfamilia del factor neurotrófico derivado de la línea celular glial ('glial cell line-derived neurotrophic factor' o GDNF); iii) factores de crecimiento no neuronales; y iv) la superfamilia de las neuroquinas (Siegel y Chauhan, 2000). Esta última familia tiene un importante papel en la respuesta inflamatoria e inmune, y a ella pertenece el VEGF que hemos utilizado como herramienta clave del presente trabajo. Ya se ha demostrado previamente el papel neuroprotector que juegan las neurotrofinas en el modelo de lesión del NMOE (Davis-López de Carrizosa y col., 2009, 2010), que es el modelo experimental del presente proyecto. En este sentido, es importante indicar que a nivel de patrón de disparo (mediante registros obtenidos en la preparación crónica del gato alerta) ni NGF, ni BDNF, ni NT-3, administrados exógenamente tras la axotomía de las motoneuronas del NMOE, consiguen recuperar completamente el disparo de las motoneuronas axotomizadas, por el contrario, la recuperación o es parcial (Davis-López de Carrizosa y col., 2009), o se acompaña de anomalías respecto al control (Davis-López de Carrizosa y col., 2010). Es por ello, junto a las evidencias de que VEGF también tiene una importante función a nivel neuronal, que nos propusimos estudiar el papel del VEGF en motoneuronas axotomizadas.

2.1. Familia del factor de crecimiento del endotelio vascular

Esta familia está formada por glicoproteínas homodiméricas con una estructura molecular similar a la de otro miembro de la familia de las citoquinas, el factor de crecimiento derivado de plaquetas ('platelet derived growth factor' o PDGF), el cual tiene un papel importante en la angiogénesis mediante el crecimiento de vasos sanguíneos a partir de tejido vascular existente, la misma función por la que fue descrito en un primer momento el VEGF. A partir de experimentos con cultivos de líneas tumorales de cobaya, se identificó y purificó una proteína con capacidad para aumentar la permeabilidad de los vasos sanguíneos de la piel, la cual se denominó factor de permeabilidad vascular ('vascular permeability factor' o VPF) (Senger y col., 1983), y a partir de otra línea celular, la del linfoma histiocítico humano U937, se describió el VPF humano (hVPF) (Conolly y col., 1989). En otro trabajo se describió, a partir de un medio de células pituitarias de bovino, una proteína con capacidad para estimular la proliferación de células endoteliales y se le denominó factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF) (Ferrara y Henzel, 1989). Ese mismo año se clonó y secuenció, tanto hVPF (Keck y col., 1989), como la molécula del VEGF humano (Leung y col., 1989), y se determinó que ambas secuencias de aminoácidos eran muy similares, tratándose finalmente de la misma proteína.

Por consenso científico a VEGF-A se le denomina VEGF, por ser el miembro de esta familia de factores tróficos más estudiado y primeramente descrito. En el texto se usará VEGF para referirse a VEGF-A. Sin embargo, en los últimos años se han identificado proteínas que comparten un alto grado de homología con VEGF-A, creándose de este modo esta familia de factores tróficos compuesta por VEGF-A, VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D, y el factor de crecimiento placentario ('placental growth factor' o PlGF) (Ruiz de Almodóvar y col., 2009), además de VEGF-E, solo descrito en una cepa de parapoxvirus de tipo Orf (Meyer y col., 1999) y svVEGF, encontrado en el veneno de una especie de víbora (Junqueira de Azevedo y col., 2001). A pesar de que esta familia de factores tróficos fue descrita a partir de su papel angiogénico y su participación en procesos vasculares, actualmente se sabe que VEGF-A y VEGF-B tienen una acción directa en células neuronales, interviniendo en procesos como la migración, el crecimiento y la supervivencia neuronal (Li y col., 2009; Lladó y col., 2013).

2.2 Receptores de VEGF (VEGFRs)

Cada miembro de la familia del VEGF ejerce sus efectos a través de su unión a tres receptores de la superfamilia de receptores tirosina-quinasa: VEGFR-1 (Flt-1), VEGFR-2 (KDR/Flk-1) y VEGFR-3 (Flt-4). Esta unión se da con distinta afinidad y selectividad, de forma que VEGF se une a VEGFR-1 y VEGFR-2, VEGF-B y PlGF los hacen a VEGFR-1, y VEGF-C y -D a VEGFR-3 y VEGFR-2.

Estos receptores están formados por dos monómeros, cada uno con un dominio extracelular de aproximadamente 750 residuos de aminoácidos, organizados en siete dominios de tipo inmunoglobulina, en el caso de VEGFR-3 son 6, ya que el quinto dominio está sustituido por un puente disulfuro. Este dominio es el lugar de unión al ligando. El dominio extracelular está seguido por una sola región transmembrana, un dominio juxtamembrana, un dominio tirosina-quinasa, que es la porción efectora del receptor, y una cola C-terminal. Los receptores suelen estar formados por el mismo tipo de monómeros, pero en ocasiones se encuentran heterodímeros, cuyo papel no está aún bien definido (Ferrara, 2004; Olsson y col., 2006).

Además de esta familia de receptores con actividad tirosina-quinasa, los distintos ligandos de la familia VEGF pueden unirse a otro tipo de receptores sin actividad enzimática denominados neuropilinas (NRP). Estos receptores interactúan con los VEGF-Rs formando complejos y modificando la afinidad y actividad de estos. Existen dos tipos de NRPs, NRP-1 y NRP-2, y en un principio fueron descritas como receptores de moléculas implicadas en la guía axonal, las semaforinas. Los distintos receptores de la familia del VEGF, sus posibles dimerizaciones y sus ligandos respectivos se ilustran en la Figura 5.

VEGFR-1

VEGFR-1, también llamado Flt-1 ('Fms-like tyrosine kinasa'), es una glicoproteína con un peso molecular aproximado de 180 kDa y está presente principalmente en células endoteliales, células no endoteliales (como macrófagos y monocitos), células de origen hematopoyético, neuronas, astrocitos y microglía reactiva (Takashashi y Shibuya, 2005; Lladó y col., 2013). Este receptor, además de localizarse transmembrana, puede encontrarse en una forma soluble, denominada sFlt-1, cuya función es secuestrar VEGF del medio circundante.

La forma transmembrana de VEGFR-1 se caracteriza por una mayor afinidad por VEGF que VEGFR-2, pero tiene una menor actividad quinasa. La eliminación del dominio

tirosina-quinasa intracelular de VEGFR-1 no afecta al desarrollo vascular (Hiratsuka y col., 1998; Ruiz de Almodovar y col., 2009), sin embargo, ratones que carecen de VEGFR-1 muestran un crecimiento excesivo de células endoteliales, así como desorganización de los vasos sanguíneos, muriendo en etapas embrionarias tempranas (Fong y col., 1995). Es por ello que se cree que este receptor actuaría como señuelo para el VEGF, atrapándolo y previniendo así la excesiva activación de VEGFR-2, que sería el principal receptor implicado en la señalización de la actividad angiogénica (Olsson y col., 2006). Además, se conoce que la activación de VEGFR-1, a través de sus diferentes ligandos, promueve la angiogénesis en células endoteliales (Fischer y col., 2008), ejerce un papel neuroprotector en modelos animales de infarto cerebral (Li y col., 2008) y de degeneración de motoneuronas (Poesen y col., 2008), estimula la migración de células microgliales *in vitro* (Forstreuter y col., 2002) e interactúa con varias proteínas transductoras de señales generando diferentes respuestas celulares (Maru y col., 1998; Autiero y col., 2003).

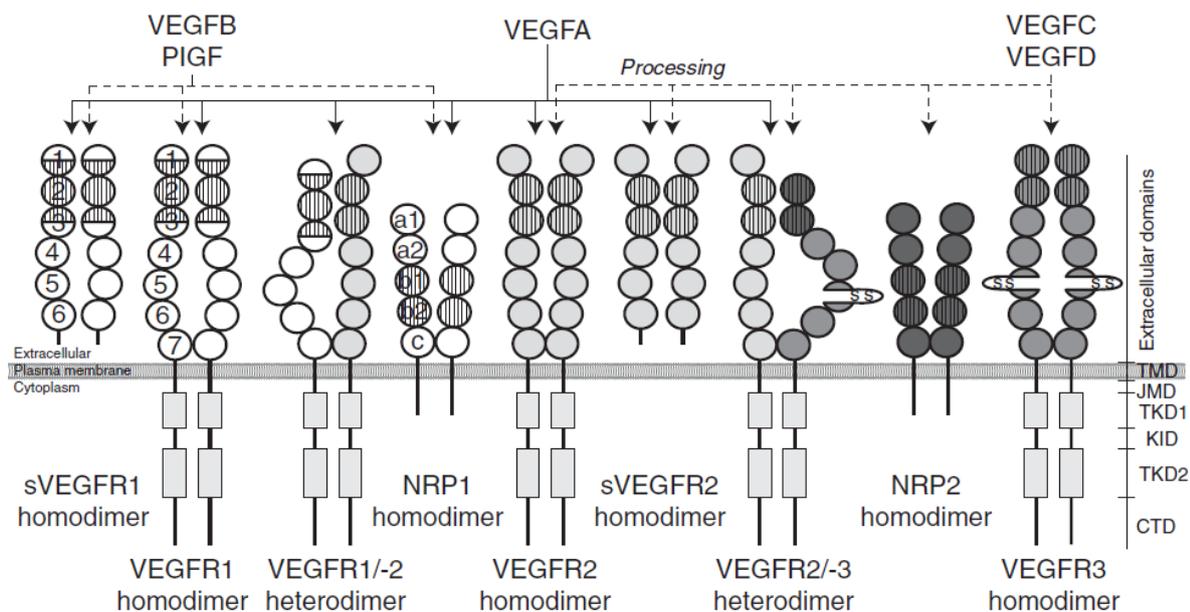


Figura 5. Receptores de VEGF y sus ligandos. VEGF-A, VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D y PIGF se unen con diferente afinidad a tres receptores de VEGF con actividad tirosina-quinasa (VEGFRs) y dos co-receptores de tipo neuropilina (NRP). Estos receptores son transmembrana, pero también existen solubles (sVEGFR) de VEGFR-1 y VEGFR-2. Para que VEGF-C y VEGF-D puedan unirse a VEGFR-2 deben ser procesados proteolíticamente. Los dominios extracelulares de unión a VEGF están indicados por círculos rayados. PIGF: factor de crecimiento placentario, TMD: dominio transmembrana, JMD: dominio juxtamembrana, TKD: dominio de unión a ATP, KID: dominio de inserción de quinasa, TKD2: dominio fosfotransferasa, CTD: dominio carboxi-terminal. Tomada de Koch y Claesson-Welsh, 2012.

VEGFR-2

VEGFR-2, también denominado KDR ('kinase insert domain receptor') en humanos y Flk-1 ('fetal liver kinase-1') en ratones, es el receptor más descrito y estudiado dentro de la familia de los VEGFRs. Tiene un peso molecular aproximado de 200 kDa y se expresa en células endoteliales linfáticas y vasculares, células de origen hematopoyético, neuronas y glía (Takashashi y Shibuya, 2005; Lange y col., 2016). Es el mayor mediador en los procesos mitogénicos, angiogénicos y de permeabilidad en el sistema vascular (Olsson y col., 2006). Su papel en el sistema vascular es imprescindible. Así, en animales en los cuales no se expresa este receptor se observa una falta de vasculogénesis y falla el desarrollo adecuado de vasos sanguíneos, lo cual resulta en la muerte a una etapa embrionaria temprana (Shalaby y col., 1995). En el sistema nervioso estimula la migración, proliferación y supervivencia de varios tipos celulares (Jin y col., 2002; Ogunshola y col., 2002). Todos estos procesos están mediados principalmente por su unión a VEGF, por el que, en comparación a VEGFR-1, tiene una menor afinidad; sin embargo, la activación de VEGFR-2 conlleva una actividad tirosina-quinasa mucho mayor y la vía de señalización intracelular a través de la cual realiza sus funciones es, principalmente, la del fosfatidilinositol-3 quinasa-Akt (PI3-K/Akt) (Gerber y col., 1998).

También se ha encontrado en ratón y plasma de humano una forma soluble de VEGFR-2 que, al igual que sVEGFR-1, mediaría en procesos regulatorios (Ebos y col., 2004; Tovar-y-Romo y Tapia, 2010).

VEGFR-3

VEGFR-3, también llamado Flt-4, es una glicoproteína de aproximadamente 195 kDa. Se encuentra principalmente en las células endoteliales de los vasos linfáticos, y es el principal responsable de la linfangiogénesis (Nagy y col., 2002). También modula la angiogénesis e induce la proliferación de precursores de oligodendrocitos y otros progenitores neurales (Le Bras y col., 2006). Se ha observado que la sobreexpresión de una forma soluble de VEGFR-3 en la piel de ratones inhibe la linfangiogénesis fetal e induce la regresión de los vasos linfáticos ya formados.

Neuropilinas

Existen dos tipos de neuropilinas, NRP-1 y NRP-2. Son proteínas transmembrana con una pequeña cola citoplasmática sin función catalítica y un peso molecular de 130 kDa

(Kawakami y col., 1996). No solo participan en el proceso de guiado axonal mediante su unión a semaforinas, sino que también están implicadas en la modulación del desarrollo de los sistemas vascular y nervioso a través de la unión a miembros de la familia VEGF y a la interacción con sus receptores, actuando como co-receptores y ampliando así la señal del VEGF. Mediante patrones de expresión y modelos genéticos se ha observado que NRP-1 parece actuar principalmente como co-receptor de VEGFR-1 y -2, mientras que NRP-2 lo es para VEGFR-3 (Fuh y col., 2000; Gluzman-Poltorak y col., 2001). Durante el desarrollo, NRP-1 se expresa preferentemente en arterias y NRP-2 en venas y vasos linfáticos (Eichmann y col., 2005); la sobreexpresión o la ausencia de NRP-1 es letal en estadios embrionarios debido al exceso de formación de vasos o anomalías vasculares, respectivamente (Fujisawa y Kitsukawa 1998). El modelo de ratón knockout de NRP-2 tiene un desarrollo normal del sistema vascular, pero muestra alteraciones en el sistema linfático (Yuan y col., 2002) y el doble knockout de NRP-1 y -2 muere al no desarrollar sistema vascular en el saco vitelino (Takashima y col., 2002).

2.3. Acciones biológicas y regulación del VEGF-A

El VEGF-A, o VEGF, es el miembro más estudiado de la familia de los VEGFs y, como se mencionó anteriormente, es considerado el miembro prototipo. Es una glicoproteína de aproximadamente 45 kDa y es homóloga al PDGF, con el cual comparte parte de su estructura molecular (Keck y col., 1989). El gen que codifica la proteína VEGF en humanos se localiza en el cromosoma 6p21.3 (Vicentini y col., 1996) y está formado por ocho exones y siete intrones, cuyo procesamiento alternativo dará lugar, principalmente, a cuatro isoformas diferentes de VEGF en función del número de aminoácidos que los conformen una vez eliminada la secuencia principal: VEGF121, VEGF165, VEGF189, VEGF206 (Tischer y col., 1991); cada una de ellas tendrá diferente masa molecular, solubilidad, funciones biológicas y afinidad de unión a receptores. VEGF165 es la isoforma más abundante y la que media la mayoría de los procesos fisiológicos descritos para el VEGF, por lo que se considera la molécula canónica, y es la que ha sido la usada en los experimentos de este trabajo.

Durante el desarrollo del sistema nervioso, el VEGF participa en varios procesos estructurales como la regulación de la formación de vasos sanguíneos, la migración neuronal y el guiado de axones en crecimiento (Mackenzie y Ruhrberg, 2012). Su secreción por parte de las células del tubo neural induce la formación de plexos vasculares perineurales y,

posteriormente, el crecimiento de vasos dentro del tubo neural que darán lugar a la vasculatura del cerebro (James y col., 2009). En el sistema nervioso adulto, VEGF regula la densidad vascular, controla la permeabilidad de los vasos sanguíneos y mantiene la fenestración de las células endoteliales del plexo coroideo (Licht y Keshet, 2013). También estimula la proliferación de células madre nerviosas y promueve la neurogénesis, induce la extensión axonal y su arborización, y promueve la plasticidad sináptica. Además, facilita la migración de células precursoras de oligodendrocitos, aumenta la migración y proliferación de células de Schwann, estimula la expresión de factores tróficos por parte de astrocitos, y promueve la proliferación, supervivencia y migración de astrocitos y microglía (Figura 6; Ruiz de Almodóvar y col., 2009).

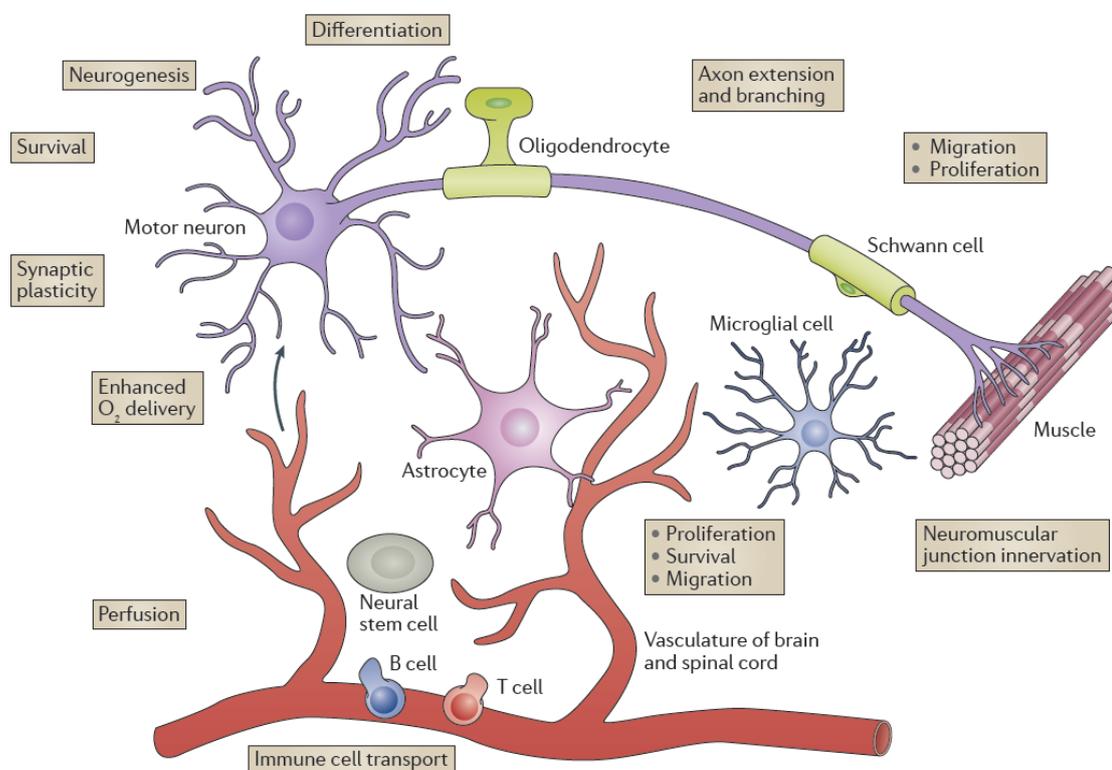


Figura 6. VEGF en el sistema nervioso central. El VEGF tiene múltiples funciones en el sistema nervioso, como el aumento de la neurogénesis, la promoción de la supervivencia en neuronas adultas, protección frente a condiciones de estrés, regular la transmisión sináptica, promover la extensión de neuritas, mejorar la perfusión vascular o actuar sobre astrocitos y células microgliales, entre otras. Tomada de Lange y col., 2016.

El mantenimiento de bajos niveles de VEGF es necesario para la supervivencia de las células endoteliales y la integridad de la barrera hematoencefálica, ya que, al ser un factor de permeabilidad vascular, una elevada presencia de VEGF puede afectar a la homeostasis del sistema nervioso central debido a trastornos a nivel de la barrera hematoencefálica (Licht y Keshet, 2013), lo cual puede provocar, entre otras consecuencias, el transporte deficiente de nutrientes, la acumulación de productos de desecho y la entrada de células inflamatorias que generan una respuesta inmune (Zhao y col., 2015).

El importante papel que desempeña el VEGF, tanto en el sistema vascular, como en el sistema nervioso, se refleja en la fuerte regulación de su expresión a través de varios mecanismos. El principal factor que induce la expresión de VEGF es la bajada en los niveles de oxígeno que se da durante una situación de hipoxia, ya que es necesaria la formación de nuevos vasos que provean de oxígeno y glucosa a la zona donde la perfusión vascular se ha visto disminuida o interrumpida. En estas condiciones, la vida media del ARNm del VEGF es mayor que en situaciones de normoxia, donde su vida media es de 30-45 minutos aproximadamente (Stein y col., 1995). Durante hipoxia las células aumentan la producción del factor de transcripción inducido por hipoxia (HIF-1), un heterodímero constituido principalmente por las subunidades HIF-1 α y HIF-1 β . HIF-1 β es de expresión constitutiva, mientras que la activación de HIF-1 α está regulada por los niveles de oxígeno. No obstante, es necesaria la actuación conjunta de ambas subunidades para activar la transcripción de genes inducibles por hipoxia. HIF-1 α es lábil en presencia de oxígeno y se degrada en condiciones aeróbicas mediante la enzima prolina hidroxilasa, la cual requiere como co-sustrato al oxígeno para llevar a cabo su función. Es por ello que, durante condiciones de hipoxia, HIF-1 α no se degrada y se trasloca al núcleo celular, donde se asocia a HIF-1 β , formando el complejo HIF-1 α /HIF-1 β . Este complejo se une al elemento de respuesta a hipoxia (HRE) presente en el promotor del gen VEGF, y tras la unión de proteínas co-activadoras (Arany y col., 1996), se produce su transcripción promoviéndose así la angiogénesis (Liu y col., 1995; Storkebaum y col., 2004). Además, la transactivación de HRE por el complejo HIF-1 α /HIF-1 β también estimula la expresión génica de eritropoyetina, transportadores de glucosa y enzimas glucolíticas (Semenza, 2000).

El ARNm de VEGF y su expresión proteica también están regulados por diversos factores, entre los que se encuentran citoquinas, el factor de necrosis tumoral (TNF- β), las interleucinas (IL-1 β y 6) y el factor de crecimiento de queratinocitos (Dor y col., 2001).

Ciertas hormonas, como la hormona estimulante del tiroides y los estrógenos, también están implicadas en la regulación (Soh y col., 1996; Ferrara y col., 1998).

La supervivencia celular promovida por el VEGF está mediada por VEGFR-2: a través de la ruta PI3K/Akt induce la expresión de proteínas anti-apoptóticas, Bcl-2 y A1, así como proteínas IAP ('inhibitor of apoptosis') que inhiben a enzimas caspasas, bloqueando así el proceso de muerte celular, o apoptosis (Koch y col., 2011). A través de este receptor, el VEGF también regula la neurogénesis en adultos actuando directamente en células madre neurales, y/o indirectamente afectando al nicho vascular de estas (Quaegebeu y col., 2011). La administración de VEGF incrementa la proliferación de células madre neuronales tanto *in vitro* como *in vivo*, así como la generación de nuevas neuronas (Jin y col., 2002). El VEGF también regula el crecimiento de nervios periféricos dañados, ayudando a recuperar la función motora y sensorial tras la lesión, y su administración facilita la regeneración axonal. Todas estas características convierten a este factor trófico en un atractivo candidato para el estudio de la neurodegeneración en diversas patologías, al ser uno de los factores neurotróficos con más propiedades neuroprotectoras.

Es importante destacar que el VEGF surgió evolutivamente a lo largo de la filogenia animal como un factor neurotrófico, ya que se ha demostrado que es esencial en el desarrollo del sistema nervioso en invertebrados carentes de sistema vascular (como *Caenorhabditis elegans*) o con un sistema vascular muy rudimentario (*Drosophila melanogaster*). En vertebrados, dotados de un sistema vascular más elaborado, el VEGF actúa como un factor pleiotrópico con actividad tanto en la vasculatura, como en el desarrollo, mantenimiento y regulación de numerosas funciones en el sistema nervioso (Figura 7; Zacchigna y col., 2008).

2.4. VEGF y esclerosis lateral amiotrófica (ELA)

La ELA es una enfermedad neurodegenerativa de las motoneuronas que empieza de forma focalizada y termina expandiéndose, generando debilidad de los músculos de las extremidades y, en general, de toda la musculatura del cuerpo, incluidos los músculos respiratorios. Este proceso acaba con la muerte de las motoneuronas de la médula espinal, del tronco del encéfalo y de neuronas de la corteza motora provocando una pérdida casi total de la movilidad de las extremidades, la capacidad de masticar, tragar y hablar, y la función respiratoria. Finalmente, esta degeneración motora conlleva una parálisis general, y tras 4-5

años del comienzo de sus síntomas, la muerte de quien la padece por incapacidad respiratoria (Robberecht y Philips, 2013).

Organism	Role of VEGF in the development of	
	Nerves —	Vessels —
<i>Caenorhabditis elegans</i>	Yes	—
<i>Drosophila melanogaster</i>	Yes	No (?)
<i>Homo sapiens</i>	Yes	Yes

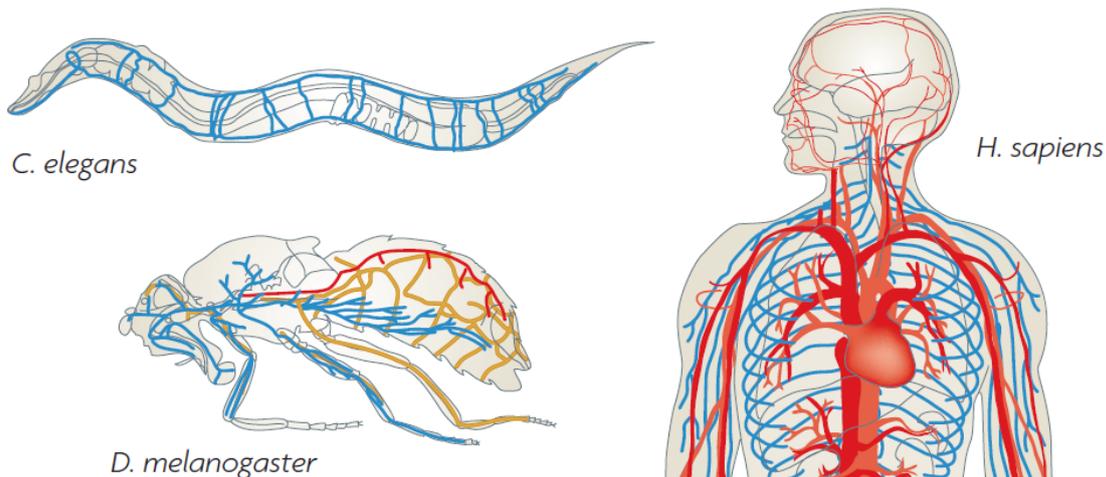


Figura 7. Evolución del VEGF como factor neuronal con múltiples efectos. En el nematodo *Caenorhabditis elegans* el VEGF actuaría como señal neuronal, ya que carece de vasculatura, pero no de sistema nervioso (trazo azul), Algo similar ocurre con el insecto *Drosophila melanogaster*, el cual posee un sistema vascular primitivo (trazo amarillo). En ambos invertebrados, con sistema vascular nulo o rudimentario, sin embargo, el VEGF es un factor esencial para el desarrollo adecuado del sistema nervioso. En cambio, en vertebrados, cuyo sistema vascular es mucho más desarrollado (trazo rojo en *Homo sapiens*) y relativamente reciente en la evolución, el VEGF controla el desarrollo tanto del sistema vascular como del nervioso. Tomado de Zacchigna y col., 2008.

Solo el 10% de casos de esta enfermedad son hereditarios (ELA familiar); y se hereda generalmente con carácter autosómico dominante. Han sido descritos más de 40 genes relacionados con la ELA, pero las mutaciones genéticas más comúnmente encontradas afectan a los genes C9orf72, SOD1, TARDBP o FUS. Estas mutaciones explican la mayoría de los casos de ELA familiar, pero también están implicados en una pequeña fracción de ELA esporádica, cuya etiología no es bien conocida (Leblond y col., 2014).

Los mecanismos moleculares que subyacen a la ELA no están claramente definidos, pero entre ellos se encuentran: señal neurotrófica deficiente, excitotoxicidad celular, alteraciones proteicas y perturbaciones en el citoesqueleto y mitocondrias. Así mismo, la alteración en tipos celulares adyacentes a las motoneuronas, como astrocitos, microglía, oligodendrocitos y células endoteliales, también juega un importante papel en el curso de la enfermedad (Garbuzova-Davis y col., 2011; Leblond y col., 2014; Peters y col., 2015).

La primera vez que se relacionó VEGF y ELA fue en los ratones mutantes VEGF^{δ/δ}. Estos animales tienen eliminado el elemento de respuesta a hipoxia de la región promotora del gen del VEGF, por lo que son incapaces de producir VEGF en situación de hipoxia. Esto conlleva, con el tiempo, a ratones VEGF^{δ/δ} adultos que presentan niveles bajos de VEGF, y en los cuales se produce debilidad muscular y una degeneración progresiva de las motoneuronas similar a la observada en enfermos de ELA (Oosthuyse y col., 2001). Estos experimentos pusieron claramente de manifiesto la relación existente entre déficit de VEGF y degeneración motoneuronal.

En el caso de la línea genética de ratones SOD1^{G93A} (con mutación en el gen de la superóxido dismutasa de cobre/cinc antioxidante o SOD1), modelo animal clásico de la ELA familiar, el proceso post-transcripcional del gen del VEGF está desregulado. La estabilización del ARN es un importante punto de control post-transcripcional para la regulación de la expresión del VEGF y de otros factores de crecimiento, pudiendo funcionar incluso como una vía de supervivencia en respuesta al estrés celular. La hipoxia, las citoquinas inflamatorias y el estrés oxidativo, por ejemplo, los cuales están relacionados con la muerte de motoneuronas en la ELA, son fuertes activadores de la estabilización del ARN. Una disfunción en este proceso podría dañar esta defensa intrínseca de la célula. Es lo que ocurre en la línea SOD1^{G93A}, la proteína mutante SOD1 desestabiliza el ARNm del VEGF produciendo una fuerte bajada en la síntesis de la proteína VEGF (Lu y col., 2007). De esta manera, en los ratones mutantes SOD1^{G93A} se observa una reducción de los niveles de VEGF, lo que podría explicar en estos animales la aparición de la enfermedad neurodegenerativa similar a la ELA humana y una esperanza de vida corta (Figura 8). En los animales resultantes del cruce entre ratones SOD1^{G93A} y VEGF^{δ/δ} la degeneración de motoneuronas es más temprana, mucho más severa y la muerte del individuo se produce antes (Lambrechts y col., 2003). En cambio, el cruce entre ratones SOD1^{G93A} y ratones que sobreexpresan VEGF en las neuronas (VEGF^{+/+}) produce dobles transgénicos que muestran

un retraso en la aparición de la parálisis y una mayor supervivencia neuronal (Carmeliet y Ruiz de Almodóvar, 2013). En los seres humanos, el polimorfismo de un solo nucleótido (-2578AA) en el gen del VEGF está asociado a niveles bajos de VEGF y aumenta la susceptibilidad a la ELA (Lambrechts y col., 2009). Todos estos resultados sugieren que el VEGF es un factor especialmente importante para la supervivencia de las motoneuronas, y que un déficit en su aporte puede producir degeneración motoneuronal.

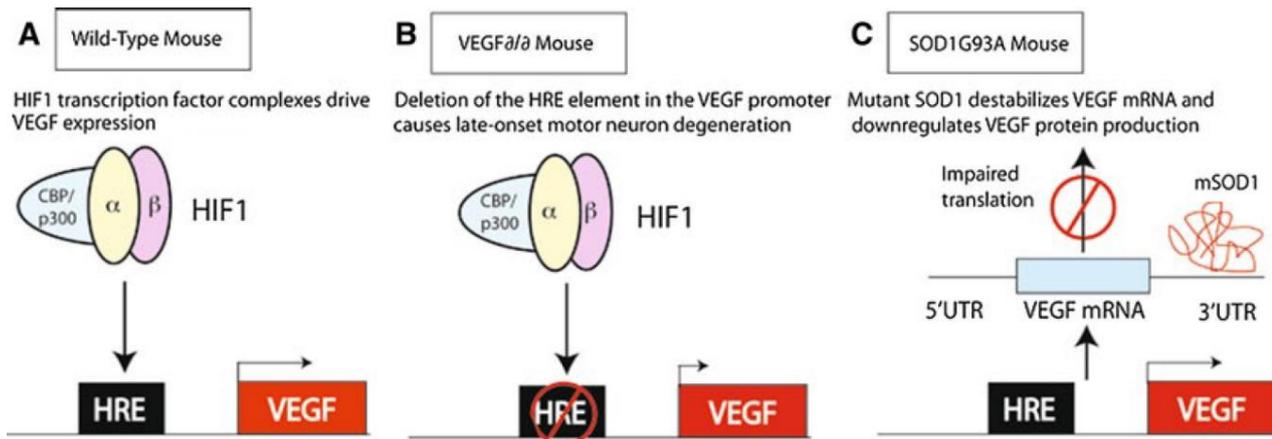


Figura 8. VEGF en enfermedades neurodegenerativas. A: en condiciones normales, HIF-1 junto a CBP/p300, se une al elemento de respuesta a hipoxia (HRE) y se produce la expresión de VEGF. B: en ratones $VEGF^{\delta/\delta}$, HRE está delecionado, no se puede unir el complejo HIF-1/CBP/p300 y como consecuencia hay una reducción en la expresión de VEGF que conlleva la muerte de las motoneuronas. C: en ratones $SOD1^{G93A}$, la proteína mutada SOD1 (mSOD1) desestabiliza el ARNm del VEGF, produciéndose una menor expresión de la proteína. Tomada de Carmeliet y Ruiz de Almodóvar, 2013.

Se ha propuesto que la degeneración de las motoneuronas producida por los bajos niveles de VEGF en los ratones $VEGF^{\delta/\delta}$ puede ocurrir mediante dos mecanismos diferentes: i) uno de ellos basado en la actividad del VEGF sobre los vasos sanguíneos; su baja expresión en estos animales llevaría progresivamente a una reducción de la perfusión del sistema nervioso central, la falta de respuesta a la hipoxia mediante angiogénesis y/o incremento de la permeabilidad vascular, podría provocar un cierto grado de isquemia crónica, con la consecuente reducción en el aporte de oxígeno y nutrientes a las neuronas (Storkebaum y col., 2011); o bien, bajos niveles de VEGF podrían producir la disfunción de las células endoteliales de la barrera hematoencefálica y con ello la alteración de la homeostasis del sistema nervioso central (Garbuzova-Davis y col., 2011; Sasaki 2015); y ii) el otro mecanismo de acción apunta a que el VEGF ejercería sus efectos neuroprotectores actuando

directamente sobre las neuronas y, por tanto, como un verdadero factor neurotrófico. Estos efectos directos se observaron en experimentos *in vitro*, donde la administración de VEGF promovió la supervivencia de las motoneuronas en condiciones normales y de estrés.

Estos efectos se producen a través de VEGFR-2, activándose la vía del PI3K–Akt que inhibe la apoptosis (Oosthuyse y col., 2001), e induciendo la expresión de la subunidad GluR2 del receptor de AMPA, reduciéndose así la vulnerabilidad de la motoneurona a la excitotoxicidad al impedir la entrada de calcio en la célula (Bogaert y col., 2010).

En animales SOD1^{G93A} diferentes estrategias de administración de VEGF retrasaron la aparición de los síntomas de la ELA, reduciendo y retrasando la degeneración de las motoneuronas. Entre estas estrategias se encuentran: la administración de vectores lentivirales retrógrados y virus adenoasociados que expresan VEGF, inyecciones intracerebroventriculares de VEGF, sobreexpresión neuronal de VEGF e implantación de células madre neurales con sobreexpresión de VEGF (Storkebaum y col., 2005; Dodge y col., 2010). También la sobreexpresión de VEGFR-2, produjo un retraso en el comienzo de los síntomas de la ELA. Estos resultados evidencian el efecto neurotrófico directo que ejerce el VEGF en las motoneuronas (Storkebaum y col., 2005).

2.5. Biología del VEGF-B

El VEGF-B fue descubierto como proteína homóloga de VEGF, PlGF y PDGF, es por ello que en un primer momento se pensó que jugaba un importante papel en la vascularización de tejidos adultos y embrionarios, particularmente en el músculo (Olofsson y col., 1996b). Sin embargo, estudios posteriores demostraron que la actividad angiogénica desencadenada por el VEGF-B es mínima, excepto en el tejido miocárdico (Li y col., 2008). En contraste con el VEGF, poco se sabe sobre el papel del VEGF-B (Nash y col., 2006).

La secuencia de aminoácidos del dominio homólogo a VEGF tiene un 47% y un 37% de similitud con la secuencia de aminoácidos de VEGF165 y PlGF, respectivamente (Li y col., 2012). Se expresa en todos los tejidos excepto el hígado, y sus niveles más altos se dan en corazón, músculo esquelético y páncreas (Nash y col., 2006).

El gen que codifica VEGF-B en humanos se encuentra en el cromosoma 11, contiene ocho exones y seis intrones (Grimmond y col., 1996) y, a diferencia de VEGF, no está regulado por hipoxia, ya que no contiene el elemento de respuesta a hipoxia (HRE) en su

región promotora y su expresión no se encuentra regulada por moléculas como los factores de crecimiento o las hormonas esteroideas (Ristimaki y col., 1998). El procesamiento alternativo de su ARNm da lugar a dos isoformas, VEGF-B186 (la isoforma utilizada en el presente trabajo) y VEGF-B167 (Olofsson y col., 1996a; Aase y col., 1999). Las proteínas maduras de ambas isoformas tienen la misma región N-terminal, homóloga a la de VEGF y PDGF, pero diferentes regiones C-terminal con diferentes propiedades, lo que influye en su distribución en los tejidos. Al igual que la proteína VEGF, VEGF-B también puede formar heterodímeros con otros miembros de la familia VEGF, aunque su función se desconoce (Olofsson y col., 1996b).

El VEGF-B se une principalmente a VEGFR-1 y NRP-1. La unión a ambos receptores promueve la supervivencia celular mediante reducción de la expresión de genes apoptóticos a través de la activación de la vía PI3/Akt (Li y col., 2008). También se ha descrito que la unión a VEGFR-1 media efectos antioxidativos promoviendo la expresión de genes antioxidativos e inhibiendo la de genes oxidativos, y regula el metabolismo de células del miocardio a través de la supresión de la ruta de señalización AMPK ('AMP-activated protein kinase') (Chen y col., 2019).

Hay estudios que sugieren que, aunque el VEGF-B se descubrió como un supuesto factor angiogénico, podría haber surgido en la evolución como un factor neuronal (Poesen y col., 2008), al igual que se comentó anteriormente para el VEGF-A. Mediante estudios genéticos en la especie *C. elegans*, organismo carente de sistema vascular, se describieron cuatro genes semejantes a los de receptores de VEGF, denominados ver-1, -2, -3 y -4, y un solo ligando VEGF/PDGF (Popovici y col., 2002). Además, se observó que estos receptores se expresaban en células de origen neural, como células gliales de soporte y neuronas quimiosensoriales. Dado que los vasos sanguíneos se desarrollaron evolutivamente más tarde que los nervios, estos estudios sugieren que la familia VEGF/PDGF podría estar involucrada, en su origen, exclusivamente en procesos neurales y que secundariamente se convirtiera en un regulador de la formación del sistema vascular, manteniendo tanto el VEGF-A como el VEGF-B su función original en el sistema nervioso.

Se conoce que el VEGF-B ejerce un papel neuroprotector en condiciones patológicas. En experimentos con ratones que no expresan VEGF-B se observan comportamientos motores normales (Bellomo y col., 2000), señal de que el VEGF-B no es necesario para la supervivencia de las motoneuronas en condiciones normales. Sin embargo, en modelos de enfermedades neurodegenerativas, los individuos deficientes en VEGF-B, o carentes del

dominio tirosina-quinasa del receptor VEGFR-1, muestran una degeneración motoneuronal más severa (Poesen y col., 2008).

En el modelo animal de ELA (SOD1^{G93A}), la administración intracerebroventricular de VEGF-B retrasa el comienzo de los déficits motores, promueve la supervivencia de las motoneuronas y alarga la esperanza de vida. Sin embargo, ratones SOD1^{G93A} que no expresan VEGF-B desarrollan una degeneración motora mayor (Poesen y col., 2008).

Si bien el VEGF-B podría ejercer sus efectos neuroprotectores indirectamente actuando vía vasculatura, varios hallazgos experimentales hacen suponer que actúa directamente sobre las neuronas: i) la administración de VEGF-B no causa defectos vasculares o anomalías en el sistema vascular; ii) las motoneuronas expresan VEGFR-1, por lo que pueden responder a VEGF-B; iii) VEGF-B186 estimula la supervivencia en cultivos de motoneuronas, de forma similar a como lo hacen el VEGF u otros factores neurotróficos; y iv) la señalización de VEGFR-1 a través del dominio de tirosina-quinasa es fundamental para proteger estas neuronas contra la degeneración (Poesen y col., 2008).

OBJETIVOS

OBJETIVOS

Los trabajos de investigación realizados en los últimos años evidencian el importante papel neuroprotector que juega el VEGF en determinados traumas neuronales. Son de especial importancia para el presente trabajo los estudios realizados en modelos animales de esclerosis lateral amiotrófica, en los cuales se correlaciona la baja expresión de VEGF con la degeneración de motoneuronas. No obstante, si bien se conoce que la administración y/o sobreexpresión de VEGF en estos modelos animales reduce la muerte neuronal, actualmente se desconoce el estado funcional en el que se encuentran estas motoneuronas; algo que resulta esencial dado el potencial clínico que podría tener la administración de este factor en enfermedades neurodegenerativas. Es por ello que nos propusimos estudiar *in vivo* la respuesta fisiológica de motoneuronas axotomizadas y posteriormente tratadas con este factor, así como un análisis de su sinaptología.

La hipótesis de este trabajo es que la administración de VEGF (A y B) en motoneuronas axotomizadas del NMOE preserva y/o restaura (en función del protocolo de administración) su fisiología normal, conservando así las propiedades de disparo y los contactos sinápticos aferentes previos a la lesión. Para validar esta hipótesis se establecieron los siguientes objetivos:

1. **Estudiar la expresión de VEGFR-1 y VEGFR-2 como principales receptores de la acción neuronal de VEGF-A y VEGF-B.** Dado que son los receptores a través de los cuales ejercen sus funciones VEGF-A (VEGFR-1 y -2) y VEGF-B (VEGFR-1), el primer paso fue confirmar su presencia en las motoneuronas del NMOE.
2. **Evaluar la capacidad neuroprotectora de VEGF-A y VEGF-B mediante un protocolo de administración inmediata.** La aplicación inmediata de estos factores tras la axotomía puede ser un claro indicador del papel que juega el VEGF en la preservación de las funciones fisiológicas y morfológicas de las motoneuronas axotomizadas.
3. **Evaluar la capacidad terapéutica de VEGF-A mediante un protocolo de administración tardía.** En este protocolo la administración del factor se realizó pasado un tiempo tras la axotomía, lo que implica que las motoneuronas axotomizadas muestran claros signos de lesión a nivel fisiológico y morfológico. De manera que este abordaje podría revelar la capacidad de este factor para restaurar las propiedades fisiológicas y morfológicas alteradas como consecuencia de la axotomía.

4. **Estudiar los efectos de la administración intracerebroventricular de VEGF-A en un protocolo de administración tardía.** Al contrario que los anteriores protocolos, en los cuales la administración del factor se realiza directamente en el extremo proximal del nervio axotomizado, la vía de administración intracerebroventricular constituye un método menos invasivo y, por tanto, con mayor interés terapéutico.
5. **Caracterizar funcional y sinápticamente las motoneuronas MIF y SIF del NMOE,** para comprobar si ambos tipos de motoneuronas sufren algún tipo de segregación en su distribución dentro del núcleo y/o segregación en el tipo de movimiento ocular que generan, así como comprobar si sus propiedades fisiológicas se ven alteradas en los diferentes protocolos de administración de VEGF-A.

**AIMS OF THE
PRESENT PROJECT**

AIMS OF THE PRESENT PROJECT

Previous works have shown the importance of the neuroprotective role that VEGF plays in some neuronal diseases. Studies carried out in animal models of amyotrophic lateral sclerosis, in which low VEGF expression is correlated with motoneuron degeneration, are of special importance for the present work. However, although it is known that the administration and/or overexpression of VEGF in these animal models reduces neuronal death, the functional state of these motoneurons remains unknown, something that is essential given the clinical potential that the administration of this factor could have in neurodegenerative diseases. For this reason, we decided to study in *in vivo* experiments the physiological response and the synaptology of axotomized motoneurons that were treated with this factor.

The main hypothesis of this work was that the administration of VEGF (A and B) in axotomized motoneurons of the abducens nucleus preserves and/or restores (depending on the administration protocol) their normal physiology, i.e., the discharge pattern and afferent synaptology previous to injury, using unitary extracellular recordings in the chronic preparation of the alert animal. To validate this hypothesis, the following objectives were established:

1. **To study the expression of VEGFR-1 and VEGFR-2 as the main receptors of the neuronal actions of VEGF-A and VEGF-B**, given that VEGF-A (which binds to both VEGFR-1 and VEGFR-2) and VEGF-B (which binds only to VEGFR-1) are the receptors through which these factors exert their functions.
2. **To evaluate the neuroprotective capacity of VEGF-A and VEGF-B using an immediate (after lesion) administration protocol.**
3. **To assess the ability of VEGF-A to physiologically recover axotomized abducens motoneurons using a delayed administration protocol** (VEGF administration 21 days after lesion).
4. **To study the effects of intracerebroventricular administration of VEGF-A in a delayed administration protocol**, as a less invasive way of administration and with therapeutic applicability.
5. **To characterize functional and synaptically MIF and SIF motoneurons of the abducens nucleus**, to test if both types of motoneurons exhibit morphophysiological

Aims of the present project

differences, especially concerning their selective participation in certain types of eye movement, and also to study whether their physiological properties were altered in the different VEGF-A administration protocols in response to axotomy.

MATERIALES, MÉTODOS Y RESULTADOS

MATERIALES, MÉTODOS Y RESULTADOS

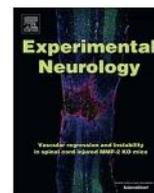
Capítulo I.

Calvo P. M., de la Cruz R. R., Pastor A. M. **Synaptic loss and firing alterations in Axotomized Motoneurons are restored by vascular endothelial growth factor (VEGF) and VEGF-B.** Exp. Neurol. 304: 67-81, 2018.



Contents lists available at ScienceDirect

Experimental Neurology

journal homepage: www.elsevier.com/locate/yexnr

Research Paper

Synaptic loss and firing alterations in Axotomized Motoneurons are restored by vascular endothelial growth factor (VEGF) and VEGF-B

Paula M. Calvo, Rosa R. de la Cruz, Angel M. Pastor*

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

ARTICLE INFO

Keywords:

Neurotrophic factors
 Lesion-induced plasticity
 Chronic single-unit recording
 Abducens nucleus
 Oculomotor system
 Axotomy
 Synaptic stripping
 Astrogliosis

ABSTRACT

Vascular endothelial growth factor (VEGF), also known as VEGF-A, was discovered due to its vasculogenic and angiogenic activity, but a neuroprotective role for VEGF was later proven for lesions and disorders. In different models of motoneuronal degeneration, VEGF administration leads to a significant reduction of motoneuronal death. However, there is no information about the physiological state of spared motoneurons. We examined the trophic role of VEGF on axotomized motoneurons with recordings in alert animals using the oculomotor system as the experimental model, complemented with a synaptic study at the confocal microscopy level. Axotomy leads to drastic alterations in the discharge characteristics of abducens motoneurons, as well as to a substantial loss of their synaptic inputs. Retrograde delivery of VEGF completely restored the discharge activity and synaptically-driven signals in injured motoneurons, as demonstrated by correlating motoneuronal firing rate with motor performance. Moreover, VEGF-treated motoneurons recovered a normal density of synaptic boutons around motoneuronal somata and in the neuropil, in contrast to the low levels of synaptic terminals found after axotomy. VEGF also reduced the astrogliosis induced by axotomy in the abducens nucleus to control values. The administration of VEGF-B produced results similar to those of VEGF. This is the first work demonstrating that VEGF and VEGF-B restore the normal operating mode and synaptic inputs on injured motoneurons. Altogether these data indicate that these molecules are relevant synaptotrophic factors for motoneurons and support their clinical potential for the treatment of motoneuronal disorders.

1. Introduction

The vascular endothelial growth factor (VEGF) was initially characterized by its vasculogenic, angiogenic properties and capacity to increase the permeability of blood vessels (Ferrara and Henzel, 1989; Senger et al., 1983; Yancopoulos et al., 2000). However, recent evidence indicates that VEGF likely exerts direct effects on neurons so that, at present, VEGF is also considered a neuroprotective factor (Lambrechts and Carmeliet, 2006; Lange et al., 2016; Storkebaum et al., 2004).

Interestingly, a causal link between low levels of VEGF and amyotrophic lateral sclerosis (ALS) has been established (Sathasivam, 2008). In particular, the design and investigation of the VEGF^{0/0} mutant mice (characterized by low levels of VEGF) have shown that these animals develop an adult-onset motoneuron disease resembling ALS (Oosthuyse et al., 2001). Also in humans, *post-mortem* studies in ALS patients have demonstrated low levels of VEGF and its receptor VEGFR-2 in the spinal cord (Brockington et al., 2006; Sathasivam, 2008). Moreover, when mice that overexpress VEGF (VEGF^{+/+}) are crossed with the mutant

mice G93A superoxide dismutase 1 (SOD1^{G93A}), a classical model of ALS, the double-transgenic mice show delayed motoneuron loss and prolonged survival as compared to the SOD1^{G93A} single-transgenic mice (Wang et al., 2007). It has been also demonstrated that the viral delivery of VEGF to SOD1^{G93A} mice delays the onset of the disease, slows the progression of motoneuronal degeneration and increases life expectancy (Azzouz et al., 2004; Wang et al., 2016). Similarly, the chronic administration of VEGF in the spinal cord prevents paralysis and motoneuronal death in rats exposed to excitotoxic motoneuron degeneration (Tovar-y-Romo et al., 2007). In addition to motoneurons, neuroprotective effects of VEGF have also been described in other neuronal types and following different types of injury, such as ischemia, epileptic stages, or neurological diseases (Carmeliet and Storkebaum, 2002; Lange et al., 2016; Matsuzaki et al., 2001; Nicoletti et al., 2008; Storkebaum et al., 2004).

VEGF is also known as VEGF-A and is the prototypical member of a related group of trophic factors, that also includes VEGF-B. VEGF-B shares a high degree of homology with VEGF, but, in contrast to VEGF, has low angiogenic activity and is not pro-inflammatory (Ruiz de

* Corresponding author at: Departamento de Fisiología, Facultad de Biología, Avda. Reina Mercedes, 6, 41012 Sevilla, Spain.
 E-mail address: ampastor@us.es (A.M. Pastor).

Cápítulo II.

Calvo P. M., Pastor A. M., de la Cruz R. R. *Vascular endothelial growth factor: an essential neurotrophic factor for motoneurons?* Neural Regen. Res. 13: 1181-1182, 2018.

● PERSPECTIVE

Vascular endothelial growth factor: an essential neurotrophic factor for motoneurons?

Vascular endothelial growth factor (VEGF), an angiogenic factor with neuroprotective effects: The VEGF was initially characterized by its vasculogenic and angiogenic activities and its capacity to promote vascular permeability (Yancopoulos et al., 2000). VEGF is also known as VEGF-A and is the prototype member of a related group of five trophic factors, VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D and placental growth factor (PlGF; Lange et al., 2016). Interestingly, VEGF-B shares a high degree of homology with VEGF but, in contrast to VEGF, has low angiogenic activity and is not pro-inflammatory. VEGF-A binds to two tyrosine kinase receptors, named VEGFR-1 and VEGFR-2, and also to the coreceptor neuropilin-1. By contrast, VEGF-B only binds to the tyrosine kinase receptor VEGFR-1 and also to the coreceptor neuropilin-1 (Lange et al., 2016).

Nowadays, it is emerging that, in addition to its vascular actions, VEGF also has a significant impact on neurons by protecting them from trauma or disease. Thus, the administration of VEGF, both *in vitro* and *in vivo* through different delivery procedures, prevents or delays the death of neurons exposed to different types of insult (Lange et al., 2016). Since the knockout mice for VEGF is not viable, leading to embryonic lethality due to insufficient development of the vascular system, cardiovascular researchers designed a mutant mice with low levels of VEGF by deleting the hypoxia response element in the promoter region of the VEGF gene. Unexpectedly, these mutant mice developed an adult-onset muscle weakness accompanied by motoneuron degeneration that resembled the human disease amyotrophic lateral sclerosis (Oosthuysen et al., 2001). This work provided a novel insight to explain motoneuron degeneration in amyotrophic lateral sclerosis, since it established, for the first time, a link between low levels of VEGF and motoneuron atrophy or death. Studies of cerebrospinal fluid samples obtained from patients suffering amyotrophic lateral sclerosis, or post-mortem investigation of human spinal cord have also confirmed a correlation between low levels of VEGF and/or its receptors and amyotrophic lateral sclerosis (Sathasivam, 2008).

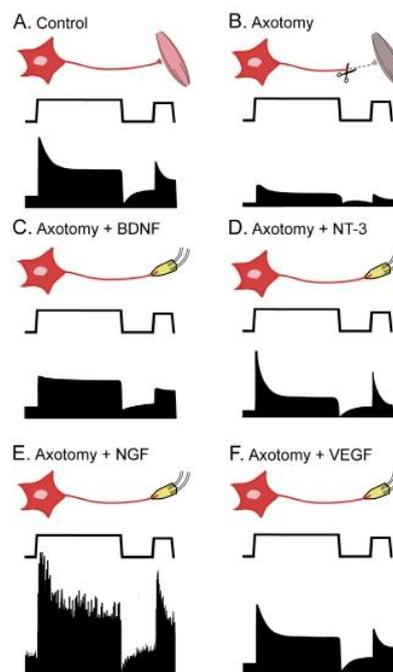
In this line, it was expected that the administration of VEGF in animal models of motoneuron degeneration might lead to neuroprotective effects. Several experiments indeed confirmed this possibility. When mice that overexpress VEGF (VEGF^{+/+}) were crossed with the mutant mice G93A superoxide dismutase 1 (SOD1^{G93A}), a classical model of amyotrophic lateral sclerosis, the double-transgenic mice showed delayed motoneuron loss and prolonged survival as compared to the SOD1^{G93A} single-transgenic mice. Similar results were obtained when VEGF was injected intrathecally using an adeno-associated virus vector (Wang et al., 2016). Moreover, VEGF delivery with retrogradely transported lentivector to SOD1^{G93A} mice also delayed the onset of the disease, slowed the progression of motoneuronal degeneration and increased life expectancy (Azzouz et al., 2004). Using a different model of motoneuron degeneration, it has also been shown that the chronic administration of VEGF in the spinal cord through a miniosmotic pump prevents the paralysis and motoneuronal death in rats exposed to excitotoxic motoneuron damage (Tovar-y-Romo et al., 2007). It is important to emphasize that VEGF can also exert neuroprotective roles in other neuronal types following different types of insult, such as ischemia, seizures, or neurological diseases (Lange et al., 2016).

VEGF neurophysiological effects on motoneurons: All these investigations have led to the statement that VEGF can be considered as a neurotrophic factor, especially for motoneurons, and have promising implications for the use of VEGF in the treatment of motoneuron disease. However, although it seems clear that VEGF can rescue vulnerable motoneurons from cell death, nothing is known about the physiological state in which these "rescued" motoneurons remain, for example, do they receive the same synaptic inputs or, on the contrary, do they lose afferent boutons as happens in severed motoneurons? Do these VEGF-treated motoneurons retain normal discharge characteristics or, rather, do they exhibit an altered firing? Damaged motoneurons not only need to be protected from cell death or atrophy, but should also maintain a normal synaptic complement and firing properties if VEGF treatment is expected to lead to functional recovery. We have pursued these questions recently (Calvo et al., 2018) in the chronic alert animal preparation, using the abducens motoneurons as

the experimental model. It should be mentioned that although extraocular motoneurons, located in the abducens, trochlear and oculomotor nuclei, are more resistant to amyotrophic lateral sclerosis, they also exhibit some signs of degeneration and cell death at later stages of the disease.

Abducens motoneurons innervate the extraocular lateral rectus muscle. Their discharge correlates with eye movements in the horizontal plane. These motoneurons show a typical tonic-phasic firing pattern, thus having eye position and eye velocity sensitivities. Following axotomy, the discharge of abducens motoneurons shows several alterations such as an overall reduction in firing rate and a significant reduction in eye position and velocity sensitivities. Moreover, axotomy is followed by the withdrawal of synaptic boutons and a reduction in the efficacy of synaptically-driven signals (Davis-López de Carrizosa et al., 2009, 2010). Our recent study (Calvo et al., 2018) indicates that VEGF administration at the time of axotomy completely prevents the lesion-induced alterations in the discharge pattern as well as the synaptic stripping. If VEGF is administered after a delayed period of axotomy, this factor is able to recover the physiological activity of abducens motoneurons (both the tonic and the phasic components) and their synaptic inputs. To the best of our knowledge, this is the first study demonstrating that a single neurotrophic factor is able to recover lesion-induced alterations in the discharge pattern and synaptic complement of motoneurons from a multidisciplinary approach that includes physiological and morphological experiments.

Previous studies in our research group have also supplied axotomized abducens motoneurons with different neurotrophic factors, *i.e.*, nerve growth factor (NGF), brain-derived neurotrophic factor (BDNF) and neurotrophic-3 (NT-3). Interestingly, neither of these factors yielded a complete recovery in firing and synaptic inputs after lesion. Thus, BDNF recovered only the tonic component of the discharge, whereas NT-3 recovered only the phasic firing (Davis-López de Carrizosa et al., 2009). These findings indicate that these two factors produced only a partial recovery. NGF administration yielded very peculiar results in axotomized abducens motoneurons, yielding to high eye position and velocity sensitivities and an irregular firing rate (Davis-López de Carrizosa et al., 2010) (Figure 1). Although the administration of neurotrophins (NGF, BDNF or NT-3) or other neurotrophic factors stimulates motoneuron survival in amyotrophic lateral sclerosis mouse models, the loss of these factors does not cause adult-onset motoneuron degeneration resembling the disease, so that muscle paralysis and motoneuron degeneration are not induced in mice lacking these factors (Lange et al., 2016). In contrast, VEGF deficit leads to the development of amyotrophic lateral sclerosis-like motoneuron degeneration and paralysis. Altogether, these findings strongly suggest that



In each panel, from top to bottom: experimental situation, eye position, and associated firing rate. (A) Control motoneurons show a typical tonic-phasic discharge proportional to eye position and velocity. (B) Axotomy decreases the discharge, affecting both the tonic and the phasic components. (C) Brain-derived neurotrophic factor (BDNF) administration recovers essentially the tonic firing. (D) Neurotrophic-3 (NT-3) treatment restores basically the phasic activity. (E) Nerve growth factor (NGF) increases both the tonic and the phasic components as well as discharge variability over control values. (F) Vascular endothelial growth factor (VEGF) treatment completely recovers the firing pattern of axotomized motoneurons to control values.

Figure 1 Schematic diagram comparing the results obtained after different neurotrophic factor administration on axotomized abducens motoneurons.

Capítulo III.

Calvo P. M., de la Cruz R. R., Pastor A. M. A ***SINGLE INTRAVENTRICULAR INJECTION OF VEGF LEADS TO LONG-TERM NEUROTHROPHIC EFFECTS IN AXOTOMIZED MOTONEURONS.***

eNeuro. 7: ENEURO.0467-19, 2020.

Disorders of the Nervous System

A Single Intraventricular Injection of VEGF Leads to Long-Term Neurotrophic Effects in Axotomized Motoneurons

Paula M. Calvo, Rosa R. de la Cruz, and Angel M. Pastor

<https://doi.org/10.1523/ENEURO.0467-19.2020>

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

Abstract

Vascular endothelial growth factor (VEGF) has been recently demonstrated to induce neuroprotective and synaptotrophic effects on lesioned neurons. Hitherto, the administration of VEGF in different animal models of lesion or disease has been conducted following a chronic protocol of administration. We questioned whether a single dose of VEGF, administered intraventricularly, could induce long-term neurotrophic effects on injured motoneurons. For this purpose, we performed in cats the axotomy of abducens motoneurons and the injection of VEGF into the fourth ventricle in the same surgical session and investigated the discharge characteristics of axotomized and treated motoneurons by single-unit extracellular recordings in the chronic alert preparation. We found that injured motoneurons treated with a single VEGF application discharged with normal characteristics, showing neuronal eye position (EP) and velocity sensitivities similar to control, thereby preventing the axotomy-induced alterations. These effects were present for a prolonged period of time (50 d) after VEGF administration. By confocal immunofluorescence we also showed that the synaptic stripping that ensues lesion was not present, rather motoneurons showed a normal synaptic coverage. Moreover, we demonstrated that VEGF did not lead to any angiogenic response pointing to a direct action of the factor on neurons. In summary, a single dose of VEGF administered just after motoneuron axotomy is able to prevent for a long time the axotomy-induced firing and synaptic alterations without any associated vascular sprouting. We consider that these data are of great relevance due to the potentiality of VEGF as a therapeutic agent in neuronal lesions and diseases.

Key words: angiogenesis; injured motoneurons; neurotrophic factors; oculomotor system; synaptic stripping

Significance Statement

Vascular endothelial growth factor (VEGF) is a novel neurotrophic factor whose chronic administration protects motoneurons from cell death in animal models of lesion or disease. Because of the promising therapeutic perspectives of this factor, it would be interesting to know whether a single dose could produce long-lasting effects on injured motoneurons. We pursued this issue by using a behaving chronic preparation showing that single intraventricular administration of VEGF prevented the firing and synaptic alterations induced by axotomy in abducens motoneurons without provoking an angiogenic response. These data demonstrate that VEGF administration does not require a continuous supply to obtain physiological improvements, data of great value due to its potential therapeutic use.

Received November 11, 2019; accepted March 23, 2020; First published May 5, 2020.

The authors declare no competing financial interests.

Author contributions: P.M.C., R.d.l.C., and A.M.P. performed research; P.M.C. analyzed data; R.d.l.C. and A.M.P. designed research; R.d.l.C. and A.M.P. wrote the paper.

This work was supported by Ministerio de Economía y Competitividad-FEDER (Grant reference: BFU2015-64515-P) in Spain and Ministerio de Ciencia, Innovación y Universidades (Grant reference: PGC2018-094654-B-100). Confocal images were performed in the Central Research Services of University of Sevilla (CITIUS). P.M.C. was a scholar of Ministerio de Economía, Industria y Competitividad (BES-2016-077912) in Spain.

Acknowledgements: Confocal images were performed in the Central Research Services of University of Sevilla (CITIUS).

Capítulo IV.

Hernández R. G., Calvo P. M., Blumer R., de la Cruz R. R., Pastor A. M.
Functional diversity of motoneurons in the oculomotor system. Proc. Natl.
Acad. Sci. U S A. 116: 3837-3846, 2019.



Functional diversity of motoneurons in the oculomotor system

Rosendo G. Hernández^{a,1}, Paula M. Calvo^{a,1}, Roland Blumer^b, Rosa R. de la Cruz^{a,2}, and Angel M. Pastor^{a,2}

^aDepartamento de Fisiología, Facultad de Biología, Universidad de Sevilla, 41012 Sevilla, Spain; and ^bCenter of Anatomy and Cell Biology, Medical Imaging Cluster, Medical University Vienna, 1090 Wien, Austria

Edited by Peter L. Strick, University of Pittsburgh, Pittsburgh, PA, and approved January 17, 2019 (received for review October 29, 2018)

Extraocular muscles contain two types of muscle fibers according to their innervation pattern: singly innervated muscle fibers (SIFs), similar to most skeletal muscle fibers, and multiply innervated muscle fibers (MIFs). Morphological studies have revealed that SIF and MIF motoneurons are segregated anatomically and receive different proportions of certain afferents, suggesting that while SIF motoneurons would participate in the whole repertoire of eye movements, MIF motoneurons would contribute only to slow eye movements and fixations. We have tested that proposal by performing single-unit recordings, in alert behaving cats, of electrophysiologically identified MIF and SIF motoneurons in the abducens nucleus. Our results show that both types of motoneuron discharge in relation to eye position and velocity, displaying a tonic-phasic firing pattern for different types of eye movement (saccades, vestibulo-ocular reflex, vergence) and gaze-holding. However, MIF motoneurons presented an overall reduced firing rate compared with SIF motoneurons, and had significantly lower recruitment threshold and also lower eye position and velocity sensitivities. Accordingly, MIF motoneurons could control mainly gaze in the off-direction, when less force is needed, whereas SIF motoneurons would contribute to increase muscle tension progressively toward the on-direction as more force is required. Anatomically, MIF and SIF motoneurons distributed intermingled within the abducens nucleus, with MIF motoneurons being smaller and having a lesser somatic synaptic coverage. Our data demonstrate the functional participation of both MIF and SIF motoneurons in fixations and slow and phasic eye movements, although their discharge properties indicate a functional segregation.

motoneuron | eye movements | oculomotor | abducens | vestibular

Extraocular muscles contain two types of muscle fiber according to the pattern of innervation of their parent motor axons. The most frequent corresponds to the singly innervated fiber (SIF), which is contacted by a large-diameter axon that forms the classic *en plaque* neuromuscular junction, similar to other mammalian skeletal muscles (1–3). SIFs produce, upon single-pulse excitation, a typical twitch response (1, 4, 5). The second class of extraocular muscle fiber is less numerous and corresponds to the multiply innervated fiber (MIF). These fibers are innervated by thinner axons, which establish multiple synaptic boutons *en grappe* extending along the whole length of the fiber (1–3, 6). In contrast to SIFs, single-pulse excitation of MIFs is not followed by a strong twitch but by a slow tension that builds up upon repetitive stimulation (1, 7–9). The presence of MIFs in mammals is extremely rare (10). Electrophysiological, histochemical, and ultrastructural features of these two types of muscle fibers correlate well with their different contractile properties (11–13).

Extraocular muscle SIFs and MIFs are innervated by motoneurons located in three brainstem nuclei: the abducens, the trochlear, and the oculomotor nuclei. The proportion of MIF motoneurons is close to 20% with respect to the total population of motoneurons in each extraocular motoneuronal pool, as has been reported in monkeys (14) and rats (15). Retrograde tracer injections in primates into the distal portion of the muscle, aimed to label only MIF axons, have shown an anatomic segregation between MIF and SIF motoneurons, with MIF motoneurons located peripherally,

whereas SIF motoneurons are distributed within the boundaries of the extraoculomotor nuclei (16, 17). Similar findings have been obtained in humans (18). In the rat, there is also some segregation, although less conspicuous (15). In the cat, the anatomical location of MIF vs. SIF motoneurons has been studied only for medial rectus motoneurons, which also show certain differences in their distribution pattern (19).

Experiments using retrograde transneuronal rabies virus or anterograde tracers have revealed some differences in the origin of afferents impinging upon MIF or SIF extraocular motoneurons. In particular, the anterograde labeling in monkeys of the lateral vestibular complex labels projections only to SIF motoneurons of the oculomotor nucleus, whereas pretectal injections label terminals only over MIF motoneurons of the oculomotor nucleus. Anterograde injections into either the abducens nucleus or the parvocellular medial vestibular nucleus, or Y group, label terminals in both MIF and SIF motoneurons of the oculomotor nucleus (20). More recently, the retrograde transneuronal transfer of rabies virus injected into the distal portion of the lateral rectus muscle of primates (containing the *en grappe* terminals of MIF motoneurons) have revealed some monosynaptic inputs to MIF abducens motoneurons: the supraoculomotor area, the central mesencephalic reticular formation, and portions of the medial vestibular and prepositus nuclei (21). In summary, MIF motoneurons have been shown to receive preferentially inputs from nuclei encoding eye position or slow eye movements, whereas SIF motoneurons are innervated by all known synaptic inputs to these motoneurons (20–23). These findings suggest that MIF and SIF motoneurons could be functionally segregated depending on the type of eye movement. Thus, it has been suggested that MIF motoneurons would contribute

Significance

Extraocular muscles have multiply innervated muscle fibers (MIFs, slow or nontwitch fibers) in addition to the classic singly innervated muscle fibers (SIF). Based on anatomical studies, it has been suggested that MIF motoneurons would assist in gaze holding and slow eye movements, whereas SIF motoneurons would participate in the whole repertoire of eye movements. We have tested that proposal in alert, behaving cats with electrophysiological identification of MIF and SIF motoneurons. Our results indicate that both motoneuronal types present a tonic-phasic discharge, and fire during all types of eye movements. However, MIF motoneurons show lower thresholds, lower eye-related sensitivities, and a reduced firing level as compared with SIF motoneurons, suggesting a role in the fine alignment of gaze.

Author contributions: R.R.d.I.C. and A.M.P. designed research; R.G.H., P.M.C., R.B., R.R.d.I.C., and A.M.P. performed research; R.G.H., P.M.C., R.B., R.R.d.I.C., and A.M.P. analyzed data; and R.R.d.I.C. and A.M.P. wrote the paper.

The authors declare no conflict of interest.

This article is a PNAS Direct Submission.

Published under the PNAS license.

¹R.G.H. and P.M.C. contributed equally to this work.

²To whom correspondence may be addressed. Email: rmcruz@us.es or ampastor@us.es.

ANNEXES

ANNEX 1. Eye position sensitivity and recruitment threshold relationship as a tool to discriminate MIF and SIF motoneurons.

ANNEX 2. Neurotrophins and VEGF somatic expression in MIF and SIF motoneurons

ANNEXES

Annex I. Eye position sensitivity and recruitment threshold relationship as a tool to discriminate MIF and SIF motoneurons.

The objective of this annex is to link the experimental data obtained about MIF and SIF motoneurons described in chapter 4 of the present work with those obtained in chapters 1, 2 and 3 on the physiological restoration in axotomized motoneurons after VEGF administration. Thereby, we could study whether the treatments selectively affected the two types of motoneurons.

The results from chapter 4 showed that MIF and SIF motoneurons, identified through the collision test in the abducens nucleus, served to demonstrate that these motoneurons have different electrophysiological characteristics in discharge pattern, mainly in neuronal sensitivity to eye position and recruitment threshold, with MIF motoneurons showing lower values of both parameters than SIF motoneurons.

With the aim of studying whether the experimental VEGF treatments affected MIF and/or SIF motoneurons differentially, we developed a method for identifying which subgroup was constituted by MIF motoneurons, with lower recruitment thresholds, and which by SIF motoneurons, with higher recruitment thresholds. So the problem of identifying MIF and SIF motoneurons from the ocular orbit in axotomized animals would be solved. These percentiles in the control group were 84 for MIF motoneurons and 13 for SIF motoneurons (Fig. AI, A). We assumed that every motoneuron above percentile 84 in its corresponding experimental group would be considered SIF, and every motoneuron below percentile 13 in its corresponding experimental group would be considered MIF (Fig. AI, B-E; grey areas).

Once we distinguish between MIF (Fig. AI; red dots) and SIF motoneurons (Fig. AI; blue dots) for each experimental group, we studied whether the treatment produced distinct effects in each group of motoneuron. The results are shown in Fig. AI, F. It can be observed that the different treatments with VEGF always resulted in a functional recovery of the motoneurons, producing values that were similar to their respective controls, for both MIF and SIF motoneuronal populations (two way ANOVA; $F_{(3,1)}=0,866$; $P=0.461$; n between 6 and 31).

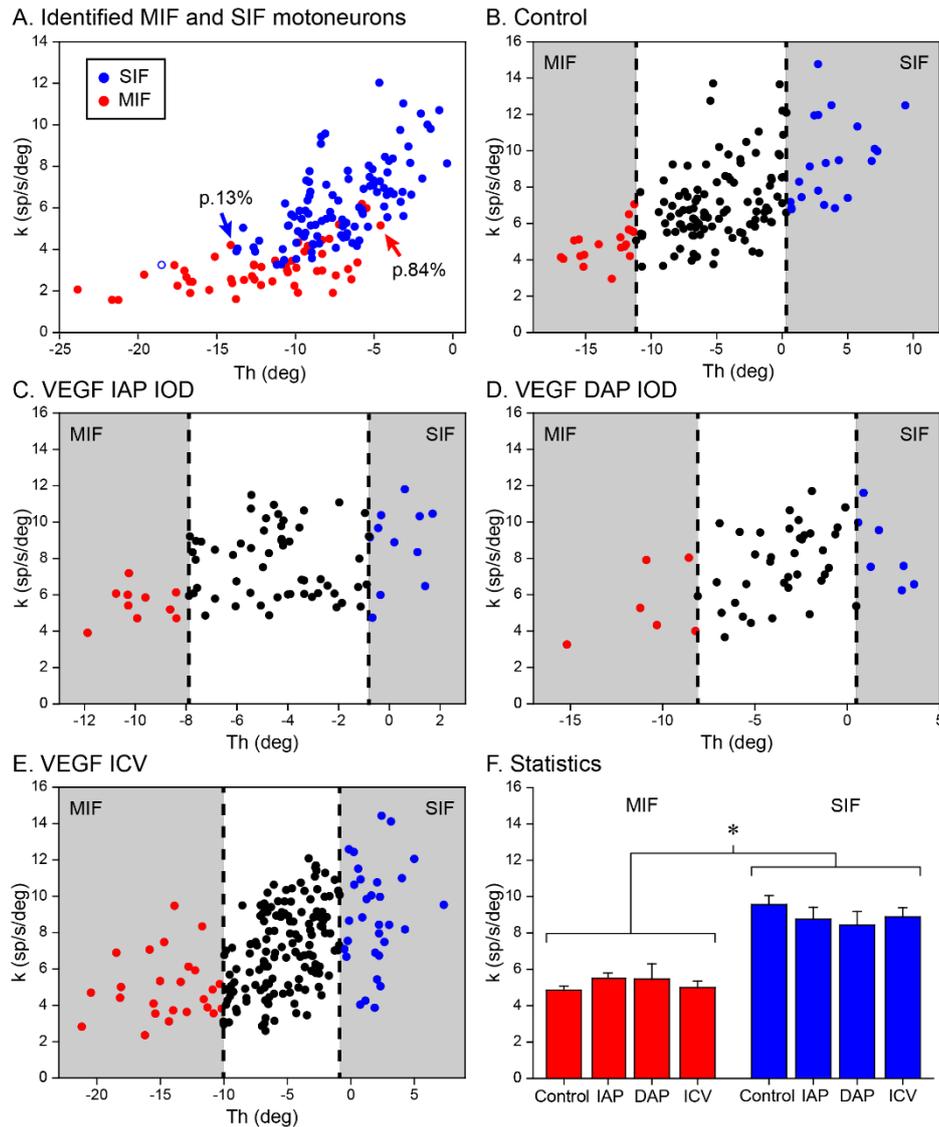


Fig. AI. (A) Plot of eye position sensitivity (k) versus recruitment threshold (Th) for control MIF (red dots) and SIF (blue dots) motoneurons. The red arrow points to the MIF motoneuron with higher recruitment threshold (percentile 84; $p.84\%$) and the blue arrow to the SIF motoneuron with lower recruitment threshold corresponding to the percentile 13 ($p.13\%$). (B-E) Same type of plot as in A but with electrophysiologically unidentified MIF and SIF motoneurons in different experimental situations from chapter I (B-D) and II (B, E), where left and right vertical dotted lines determine the percentile 13 and 84, respectively. Blue dots are considered SIF motoneurons (dots above percentile 84) and red dots MIF motoneurons (dots below percentile 13). (F) Bar chart comparing k values of the so determined MIF (red bars) and SIF (blue bars) motoneurons in the different experimental situations. There were no significant differences between groups within the same class of motoneuron. The asterisk means significant differences ($P < 0.001$) between MIF and SIF motoneurons irrespective of the treatment. Data represent mean and SEM.

Annex II. Neurotrophins and VEGF somatic expression in MIF and SIF motoneurons.

The objective of this annex is to explore the possible molecular bases of the differences in the electrophysiological characteristics of MIF and SIF motoneurons described in chapter 4.

Previous results in this laboratory (Davis-López de Carrizosa et al., 2009) showed that the recovery of the firing pattern in axotomized motoneurons is different depending on the neurotrophin that is applied. It was shown that each neurotrophin (BDNF and NT-3) behaved in a complementary fashion when applied separately after the axotomy; in particular, BDNF restores the tonic firing pattern and NT-3 the bursting firing of axotomized motoneurons. The neurotrophin NGF was then used and it was found, after axotomy, that NGF administration produced a higher recruitment threshold and discharge variability (Davis-López de Carrizosa et al., 2010).

After neurotrophins, the interest of the group turned to other neurotrophic factors that could contribute to the recovery of axotomized motoneurons and, in view of data recently published in the literature, VEGF appeared as a good candidate. The results of the present work (chapters 1, 2 and 3) has shown that both VEGF-A and VEGF-B produced the absolute restoration of the firing pattern of axotomized motoneurons when applied through the proximal stump of the cut nerve, and that VEGF-A, administered intraventricularly, also recovered the firing of injured motoneurons.

Taking all together, our aim was to check whether the different electrophysiological characteristics of both types of motoneurons (MIF and SIF) could correlate with different amounts of neurotrophic factors, in particular, NGF, BDNF, NT-3 and VEGF-A. As can be seen in the right column of figure AII, there were no differences in the neurotrophic factor soma expression between control MIF and SIF motoneurons (student t-tests: n=39 MIF and n=41 SIF motoneurons, $t_{(78)}=-0.707$, $P=0.482$, for VEGF; n=42 MIF and n=45 SIF motoneurons, $t_{(85)}=1.827$, $P=0.071$, for BDNF; n=35 MIF and n=34 SIF motoneurons, $t_{(67)}=0.559$, $P=0.578$, for NT-3; and n=35 MIF and n=37 SIF motoneurons, $t_{(70)}=1.352$, $P=0.181$, for NGF). These data suggest that the electrophysiological results obtained after neurotrophic factor application in our axotomy model could be the result of a target dependence of the motoneurons after lesion rather than the somatic content of each factor.

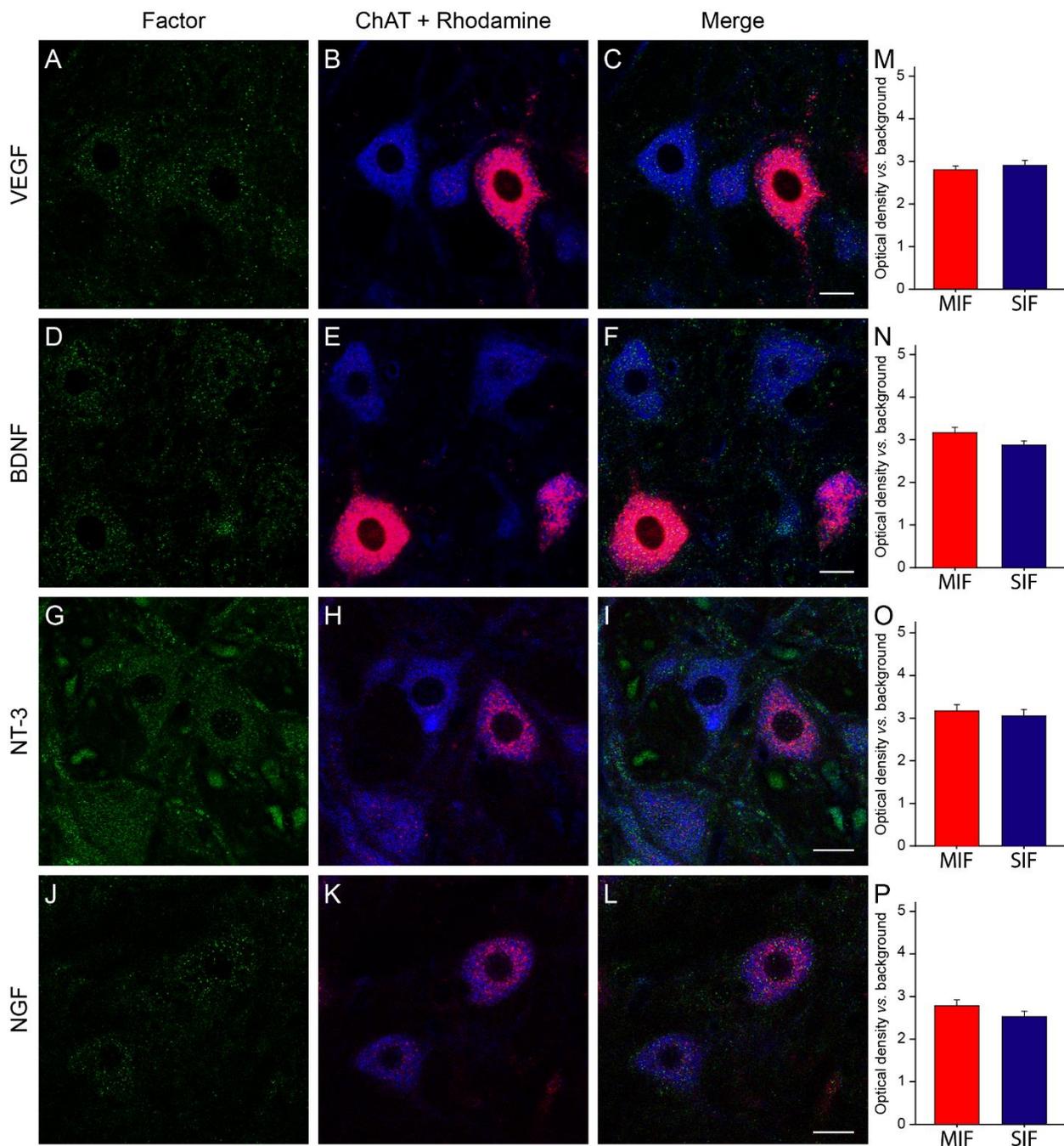


Fig. AII. (A-L) Immunolabeling against VEGF (A), BDNF (D), NT-3 (G) and NGF (J) in single confocal sections showing control SIF and MIF motoneurons (green). (B, E, H, K) Retrogradely-labeled rhodamine cells (red) correspond to MIF motoneurons; the blue staining corresponds to immunolabeling against ChAT. Therefore, doubly-labeled cells (red and blue) correspond to MIF motoneurons, whereas those cells positive only for ChAT (blue alone) were SIF motoneurons. (C, F, I, L) Merged images of the first two columns. (M-P) Bar charts comparing the cytoplasmic optical density of VEGF and each neurotrophin between MIF (red) and SIF (blue) motoneurons. No differences were found for each neurotrophic factor tested. Data are mean \pm SEM. Scale bars: 20 μm .

RESUMEN DE RESULTADOS

RESUMEN DE RESULTADOS

Capítulo I. ‘Synaptic loss and firing alterations in Axotomized Motoneurons are restored by vascular endothelial growth factor (VEGF) and VEGF-B’

En este artículo se demostró, en primer lugar, que los receptores de VEGF-A (VEGFR-1 y VEGFR-2) y VEGF-B (VEGFR-1) están presentes tanto en las motoneuronas del núcleo abducens como en sus axones, y en la sinapsis neuromuscular que forman con el músculo extraocular recto lateral. Por otra parte, en el músculo recto lateral se comprobó que hay presencia del factor VEGF, apoyando la hipótesis de que el músculo actuaría como fuente de este factor y que podría transportarse retrógradamente hacia el núcleo abducens.

Tras la sección del nervio abducens (VI par craneal) tuvo lugar una fuerte caída en ambos componentes del patrón tónico-fásico de la tasa de disparo de las motoneuronas, tanto durante movimientos oculares espontáneos como en los inducidos vestibularmente. Del mismo modo, se redujeron las sensibilidades a la posición y a la velocidad ocular en ambas situaciones experimentales (i.e., k_s , k_v , r_s , r_v), y se demostró una pérdida de botones sinápticos excitadores e inhibidores, tanto en los somas de las motoneuronas, como en el neuropilo que las rodea, así como una reacción glial en el núcleo en respuesta a la lesión.

Con la administración exógena cada dos días de VEGF-A, a través del cabo proximal del nervio seccionado introducido en un dispositivo intraorbital (DIO), se comprobó una recuperación del patrón de disparo hasta niveles similares al control, tanto durante movimientos oculares espontáneos como en aquellos inducidos por estimulación vestibular, esto es, las sensibilidades a la posición (k_s y k_v) y a la velocidad (r_s y r_v) se recuperaron, y lo mismo ocurrió cuando se administró VEGF-B tras la lesión. Del mismo modo, se recuperaron las entradas sinápticas a nivel de soma y neuropilo, y la reacción glial regresó a niveles control. Esta recuperación del patrón de disparo ocurrió en ambos tipos de protocolos de administración de VEGF-A: 1) el protocolo inmediato (IAP), en el que el VEGF-A se aplicó desde el momento mismo de la lesión, y 2) el protocolo tardío (DAP), en el que la administración se inició pasadas tres semanas desde la axotomía.

Cuando entre dos periodos de tratamiento de VEGF (VEGF Tr1 IAP y VEGF Tr2 IAP) se administró VEGF junto a un inhibidor de su receptor VEGFR-2 (Inh+VEGF), se observaron resultados intermedios. Esto es, los valores de sensibilidad a la posición (k_s) y a la velocidad (r_s) obtenidos en los registros neurofisiológicos durante movimientos

espontáneos fueron significativamente mayores que los obtenidos durante axotomía, pero no llegaron a ser significativamente similares a los datos control ni a los obtenidos durante el tratamiento inicial con VEGF (VEGF Tr1 IAP). Al administrar de nuevo VEGF, pero esta vez sin el inhibidor (VEGF Tr2 IAP), k_s y r_s volvieron a ser similares a las sensibilidades obtenidas durante control y VEGF Tr1 IAP, siendo significativamente diferentes a los valores de axotomía. Respecto a las sensibilidades durante estimulación vestibular (k_v y r_v), se pudo observar que la administración del inhibidor junto a VEGF (Inh+VEGF) no produjo ningún cambio en estos parámetros respecto a los controles ni a las sensibilidades obtenidas durante ambos periodos, previo y posterior, de VEGF (VEGF Tr1 IAP y VEGF Tr2 IAP, respectivamente), pero todas ellas sí fueron significativamente mayores que las obtenidas durante axotomía. Es decir, que el efecto del inhibidor del VEGFR-2 tuvo lugar solo sobre las entradas sinápticas responsables de los movimientos oculares espontáneos, y no en aquellas implicadas en la generación de los movimientos oculares de origen vestibular.

Capítulo II. ‘Vascular endothelial growth factor: an essential neurotrophic factor for motoneurons?’

Los trabajos pioneros sobre el factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF), y específicamente el VEGF-A, determinaron principalmente su actividad angiogénica o de formación de nuevos vasos sanguíneos. Estudios posteriores demostraron que no solo posee esa actividad relacionada con el sistema vascular, sino que, además, el VEGF-A posee un importante papel en la protección de las neuronas frente a la lesión o el trauma causados por diferentes situaciones adversas, como derrames cerebrales o enfermedades degenerativas.

A partir de estos trabajos se comenzó a considerar al VEGF como un factor neurotrófico y se empezó a estudiar su papel en el sistema nervioso. Lo que se desconocía hasta entonces era el estado funcional en el que quedaban las neuronas dañadas que habían sido protegidas de la degeneración o muerte celular tras la administración del VEGF, y este fue el motivo que nos propusimos en nuestro trabajo: el estudio electrofisiológico y morfológico de motoneuronas del núcleo abducens lesionadas y tratadas con VEGF-A siguiendo diferentes protocolos de administración. Los resultados ya tratados en los capítulos anteriores del presente trabajo nos permitieron postular al VEGF como un factor neurotrófico de las motoneuronas mucho más eficaz que las neurotrofinas, las cuales ya habían sido administradas a motoneurons axotomizadas en nuestro modelo experimental, pero no produjeron una recuperación completa hasta los valores controles en los parámetros morfofisiológicos medidos (Davis-López de Carrizosa et al., 2009, 2010), como sí se obtuvo con el VEGF (presente trabajo).

Capítulo III. 'A Single Intraventricular Injection of VEGF Leads to Long-Term Neurotrophic Effects in Axotomized Motoneurons'

En este trabajo se mostraron los efectos, inmediatamente tras la lesión, de una sola dosis de VEGF-A administrada a través del cuarto ventrículo, en una localización 1 mm rostral respecto al núcleo abducens. Como se comprobó en estudios previos, el patrón de disparo de las motoneuronas del núcleo abducens, el cual sigue un esquema tónico-fásico que correlaciona con la posición y la velocidad del ojo, respectivamente, muestra una disminución significativa en frecuencia tras la axotomía del nervio abducens. Los datos de este trabajo mostraron cómo la administración intracerebroventricular de VEGF-A inmediatamente tras la lesión recuperó la frecuencia de disparo de las células lesionadas, y sus valores de sensibilidad a la posición (k) y a la velocidad (r), tanto durante movimientos oculares espontáneos (k_s y r_s) como inducidos por estimulación vestibular (k_v y r_v), siendo similares a los valores obtenidos en las células del grupo control. Cabe resaltar que estos efectos sobre la actividad electrofisiológica se observaron a largo plazo tras la axotomía, sin que se evidenciaron signos de lesión durante el tiempo que siguió a la administración de una dosis única de VEGF-A (50 días, tiempo máximo del estudio).

Otra característica conocida de las motoneuronas axotomizadas del núcleo abducens es una pérdida de parte de su cobertura sináptica, lo cual no solo ocurre a nivel del soma celular, sino que también se puede observar en el tejido adyacente o neuropilo. El presente trabajo demostró que la administración de una sola dosis de VEGF-A tras la lesión a través del cuarto ventrículo, y pasadas 3 semanas, condujo a una recuperación de botones sinápticos, tanto a nivel del soma de las motoneuronas, como en el neuropilo, obteniéndose valores similares a los controles. Este estudio también demostró que la bien conocida respuesta astrogliar que tiene lugar en el núcleo tras la lesión se evitó tras esta forma de administración de VEGF-A.

Por último, dado que el VEGF-A es un factor angiogénico, se procedió a realizar un estudio de la densidad de vasos sanguíneos (%), su diámetro (μm) y su número por cada $2500 \mu\text{m}^2$ en el tejido del núcleo abducens de animales control, axotomizados y aquellos que recibieron una sola dosis intraventricular de VEGF-A (administrada justo tras la lesión). De este estudio se confirmó que los tres parámetros morfométricos fueron similares entre las tres situaciones experimentales y, por tanto, indican que no se produjeron nuevos vasos sanguíneos tras la administración del VEGF-A, con lo que la recuperación obtenida en las motoneuronas axotomizadas no pudo explicarse por la acción angiogénica del VEGF-A (que

podría aportar más oxígeno y nutrientes a las neuronas dañadas y facilitar la recuperación), proponiéndose que se debió a la actividad neurotrófica de este factor actuando directamente sobre las motoneuronas. Además, al ser la administración a través del cuarto ventrículo, se reprodujo el estudio morfométrico en una estructura no lesionada, como fue el núcleo vestibular medial, obteniéndose resultados idénticos, esto es, no hubo angiogénesis asociada a la administración de VEGF-A a través del cuarto ventrículo en este núcleo vestibular a la dosis que se empleó en este trabajo.

Capítulo IV. 'Functional diversity of motoneurons in the oculomotor system'

En este trabajo se desarrolló un método para la identificación electrofisiológica de motoneuronas MIF y SIF que había sido eludido hasta la fecha tras 50 años de la era neurofisiológica oculomotora moderna. Se denominan motoneuronas SIF (singly innervated muscle fiber) a aquellas que forman una gran placa neuromuscular por cada fibra muscular con la que contactan. Del mismo modo se denominan motoneuronas MIF (multiply innervated muscle fiber) a aquellas que forman una cadena de pequeños contactos sinápticos a todo lo largo de una misma fibra muscular. Para la identificación de los distintos tipos de motoneuronas se implantó un electrodo de estimulación a nivel del nervio abducens, el cual sirvió para activar antidrómicamente a todas las motoneuronas de este núcleo (i.e., MIF y SIF), y un segundo electrodo de estimulación en la unión miotendinosa del músculo recto lateral, con el fin de activar antidrómicamente solo a las motoneuronas MIF. Cuando se aisló electrofisiológicamente una motoneurona, se procedió a realizar el test de colisión entre la espiga ortodrómica (espontánea) y la espiga antidrómica (inducida tras la estimulación eléctrica) para determinar el tipo de motoneurona aislada. Las motoneuronas SIF se activaron antidrómicamente y colisionaron solo desde el electrodo situado en el nervio, mientras que las motoneuronas MIF se activaron y colisionaron tanto desde el electrodo del nervio como desde el situado en la unión miotendinosa. Un primer resultado que se observó entre los dos tipos de motoneuronas fue la diferente latencia de activación antidrómica entre MIF y SIF, que se midió como el tiempo que transcurre entre el comienzo del estímulo antidrómico y el pico negativo de la espiga antidrómica, con valores mayores para las motoneuronas MIF que para las SIF, indicativo de una menor velocidad de conducción axonal en las primeras.

Tras la identificación de cada tipo de motoneurona se pudo comprobar que ambos tipos presentaron un patrón de disparo tónico-fásico, aumentando su frecuencia de disparo para movimientos dirigidos hacia el lado homolateral al sitio de registro. No obstante, se encontraron importantes diferencias entre ambos tipos de motoneuronas. En general, la frecuencia de disparo de las motoneuronas MIF fue menor que la de las SIF, y exhibieron una fase fásica de menor frecuencia. En definitiva, las motoneuronas MIF tuvieron una menor sensibilidad a la posición (k) y a la velocidad (r) ocular, así como un menor umbral de reclutamiento (Th) y una menor tasa de disparo en la posición central del ojo en la órbita (F_0) respecto a las SIF. Otra diferencia electrofisiológica entre ambos tipos de células fue la latencia entre la tasa de disparo máxima durante un movimiento sacádico y el pico máximo de velocidad de este, que resultó ser mayor en las motoneuronas SIF respecto de las MIF.

Este resultado indicó que las motoneuronas MIF influirían más durante la fase terminal del sacádico, mientras que las motoneuronas SIF jugarían un papel más importante en generar el pulso necesario para iniciar el movimiento.

La relación entre los parámetros obtenidos a partir del análisis conjunto de la señal electrofisiológica y de la posición/velocidad ocular mostraron una fuerte correlación positiva entre la sensibilidad a la posición del ojo (k) y el umbral de reclutamiento (Th), y la sensibilidad a la posición (k) y la sensibilidad a la velocidad del ojo (r), para ambos tipos de motoneuronas, no existiendo correlación cuando se compararon ' r vs. Th ' para MIF y SIF por separado, pero sí para el conjunto en completo (MIF+SIF). De manera que cuando se representaron todos estos parámetros juntos en una gráfica 3D se pudieron distinguir dos grupos de datos separados entre sí, con algo de solapamiento entre ellos: el grupo de las motoneuronas MIF, con menor k , r y Th , y el grupo de las SIF, con mayor k , r , y Th . Otra relación que se demostró, cuando los datos de ambos tipos de neuronas se trataron como uno solo, es la que existió entre k y la latencia de activación antidrómica, y Th y latencia antidrómica, pero en este caso la relación fue inversa, es decir, a mayor sensibilidad y umbral de reclutamiento, menor latencia de activación antidrómica.

Lo descrito hasta ahora se corresponde con lo que ocurre durante movimientos oculares conjugados en el plano horizontal, pero durante movimientos oculares disyuntivos de vergencia se observó que tanto las motoneuronas MIF como las SIF pueden actuar siguiendo cuatro perfiles diferentes: apropiado, inapropiado, variable y sin respuesta. Las motoneuronas MIF tienen un perfil mayormente 'apropiado' durante los movimientos de vergencia, mientras que las SIF lo tienen 'variable'; las motoneuronas con perfil 'inapropiado' o 'sin respuesta' constituyeron ser un número bajo que no distinguió entre MIF y SIF.

Durante movimientos oculares inducidos por estimulación vestibular, ambos tipos mostraron un patrón de disparo que se correspondió con las fases lentas y rápidas del nistagmo, siempre que el movimiento del ojo fuera en el sentido homolateral. En este caso, las sensibilidades a la posición (k_v) y a la velocidad (r_v) se calcularon mediante un análisis de regresión múltiple, que reflejó valores menores de ambos parámetros para las motoneuronas MIF respecto a las SIF; no obstante, los coeficientes de determinación (R^2) de los análisis de MIF y SIF fueron altos y no mostraron diferencias entre ellos.

Respecto a la distribución de las motoneuronas MIF y SIF dentro del núcleo abducens, se pudo comprobar, gracias al marcaje retrógrado específico de las motoneuronas MIF con rodamina (inyectada en la región miotendinosa del músculo recto lateral) y al inmunomarcaje contra ChAT (acetilcolina transferasa) de SIF y MIF, que ambos tipos de células se encontraron distribuidas entremezcladas y sin seguir ningún patrón específico dentro del núcleo. Así mismo, con este marcaje se pudo observar que las motoneuronas MIF tuvieron un tamaño significativamente menor que el de las SIF, en congruencia con los datos fisiológicos que mostraron mayor latencia de activación antidrómica en la población de motoneuronas MIF. Las motoneuronas MIF representaron el 19% del total de motoneuronas de núcleo abducens. En relación a la cobertura sináptica, analizada a nivel de microscopía confocal, las motoneuronas MIF mostraron un porcentaje menor de su perímetro somático contactado por botones sinápticos, identificados como sinaptofisina-inmunorreactivos (sinapsis excitadoras e inhibitoras) y también por botones sinápticos de naturaleza inhibitora, identificados como VGAT-inmunorreactivos (sinapsis inhibitoras), en comparación con las motoneuronas SIF, pero el balance de entradas inhibitorias respecto al total de sinapsis fue similar para ambos tipos motoneuronales.

SUMMARY OF RESULTS

SUMMARY OF RESULTS

Chapter I. ‘Synaptic loss and firing alterations in Axotomized Motoneurons are restored by vascular endothelial growth factor (VEGF) and VEGF-B’

In this article, it was first demonstrated that the receptors for VEGF-A (VEGFR-1 and VEGFR-2) and VEGF-B (VEGFR-1) are present both in the motoneurons of the abducens nucleus and their axons, and in the neuromuscular synapse that they form with the extraocular lateral rectus muscle. On the other hand, the presence of VEGF was found in the lateral rectus muscle, supporting the hypothesis that the muscle would act as a source of this factor and that it could be transported retrogradely to the abducens nucleus.

After the section of the abducens nerve (VIth cranial nerve), there was a sharp fall in both components of the tonic-phasic pattern of the firing rate of motoneurons, during both spontaneous eye movements and those induced vestibularly. In the same way, sensitivities to eye position and velocity were reduced in both experimental situations (i.e., k_s , k_v , r_s , r_v). Finally, a loss of excitatory and inhibitory synaptic boutons was demonstrated, both in the cell body of the motoneurons and in the neuropil that surrounds them, as well as an astroglial reaction in the nucleus in response to injury.

With the exogenous administration of VEGF-A every two days, through the proximal stump of the sectioned nerve introduced in to an intraorbital device (IOD), a recovery of the firing pattern to levels similar to control was found, during both spontaneous eye movements and those induced by vestibular stimulation, that is, neuronal sensitivities to eye position (k_s and k_v) and to eye velocity (r_s and r_v) recovered, and the same occurred when VEGF-B was administered after injury. Similarly, synaptic inputs at the soma and neuropil levels were recovered, and the glial reaction returned to control levels. This recovery of the firing pattern occurred in both types of VEGF-A administration protocols: 1) the immediate administration protocol (IAP), in which VEGF-A was applied from the moment of injury, and 2) the delayed administration protocol (DAP), in which the VEGF delivery began three weeks after axotomy.

We observed intermediate results between two periods of VEGF treatment (namely VEGF Tr1 IAP and VEGF Tr2 IAP) when VEGF was administered together with an inhibitor of its VEGFR-2 receptor (Inh + VEGF). That is, the neuronal sensitivity values to eye position (k_s) and eye velocity (r_s) obtained in the neurophysiological recordings during

spontaneous movements were significantly higher than those obtained during axotomy, but they did not become significantly similar to the control data or to those obtained during the initial treatment with VEGF (VEGF Tr1 IAP). When VEGF was administered again, but this time without the inhibitor (VEGF Tr2 IAP), k_s and r_s were again similar to the sensitivities obtained during control and VEGF Tr1 IAP, being significantly different from the axotomy values. Regarding the neuronal sensitivities during vestibular stimulation (k_v and r_v), it was observed that the administration of the inhibitor together with VEGF (Inh + VEGF) did not produce any change in these parameters with respect to control or during both periods, prior and later, of VEGF (VEGF Tr1 IAP and VEGF Tr2 IAP, respectively), but all of them were significantly higher than those obtained during axotomy. Therefore, the effect of the VEGFR-2 inhibitor took place only on the synaptic inputs responsible for spontaneous eye movements, and not on those involved in the generation of vestibular eye movements.

Chapter II. ‘Vascular endothelial growth factor: an essential neurotrophic factor for motoneurons?’

The pioneering work on vascular endothelial growth factor (VEGF), and specifically VEGF-A, mainly determined its angiogenic activity. Later studies showed that VEGF-A not only has this activity related to the vascular system, but also exerts an important role in protecting neurons against injury or trauma caused by different adverse situations, such as strokes or degenerative diseases.

From these works, VEGF began to be considered as a neurotrophic factor and its role in the nervous system started to be studied. What was unknown until then was the functional state in which the damaged neurons remained after protection from degeneration or cell death due to the administration of VEGF, and this was the purpose we pursued in our work: the electrophysiological and morphological study of injured abducens nucleus motoneurons treated with VEGF-A following different administration protocols. The results already discussed in the previous chapters of this work allowed us to postulate VEGF as a much more efficient neurotrophic factor of motoneurons than neurotrophins, which had already been administered to axotomized motoneurons in our experimental model, but did not produce a complete recovery up to control values in the morphophysiological parameters measured (Davis-López de Carrizosa et al., 2009, 2010), as it was obtained with VEGF (present work).

Chapter III. 'A Single Intraventricular Injection of VEGF Leads to Long-Term Neurotrophic Effects in Axotomized Motoneurons'

In this work, we showed the effects after injury of a single dose of VEGF-A, applied on the same surgical session as the lesion, through the fourth ventricle, in a location 1 mm rostral with respect to the abducens nucleus. As confirmed in previous studies, the firing pattern of the motoneurons of the abducens nucleus, which follows a tonic-phasic profile that correlates with the position and velocity of the eye, respectively, shows a significant decrease in frequency after axotomy of the abducens nerve. This work showed how the intracerebroventricular administration of VEGF-A, immediately after injury, recovered the firing frequency of the injured cells, and their sensitivity values to position (k) and velocity (r), during both spontaneous eye movements (k_s and r_s) and those induced by vestibular stimulation (k_v and r_v), being similar to the values obtained from cells of the control group. It should be noted that these effects on electrophysiological activity were observed in the long term after axotomy, with no evidence of alterations in the discharge pattern of motoneurons during the time that followed the administration of a single dose of VEGF-A (50 days, maximum study time).

Another known characteristic of axotomized motoneurons of the abducens nucleus is a loss of part of their synaptic coverage, which not only occurs at the level of the cell soma but can also be observed in the adjacent tissue or neuropil. The present work demonstrated that the administration of a single dose of VEGF-A after injury through the fourth ventricle, and after 3 weeks, led to a recovery of synaptic boutons, both at the level of the motoneuron soma and in the neuropil, obtaining values that were similar to controls. This study also demonstrated that the well-known astroglial response that occurs in the nucleus after injury was avoided after this form of VEGF-A administration.

Finally, since VEGF-A is an angiogenic factor, a study was carried out of the density of blood vessels (%), their diameter (μm) and their number per $2500 \mu\text{m}^2$, in the tissue of the abducens nucleus of control, axotomized, and those who received a single intraventricular dose of VEGF-A (administered just after injury) animals. From this study it was confirmed that the three morphometric parameters were similar between the three experimental situations and, therefore, indicated that no new blood vessels were produced after the administration of VEGF-A. These data revealed that the recovery obtained in the axotomized motoneurons could not be explained by the angiogenic action of VEGF-A

(which could provide more oxygen and nutrients to damaged neurons and thus facilitate recovery), and, in consequence, we proposed that it was due to the neurotrophic activity of this factor acting directly on motoneurons. In addition, since the administration was intraventricular, the morphometric study was reproduced in an undamaged structure, such as the medial vestibular nucleus, obtaining identical results, that is, there was no angiogenesis associated with the administration of VEGF-A through of the fourth ventricle in this vestibular nucleus at the dose used in this study.

Chapter IV. 'Functional diversity of motoneurons in the oculomotor system'

In this work, we developed a method for the electrophysiological identification of MIF and SIF motoneurons that had been eluded to date after 50 years of the modern oculomotor neurophysiological era. SIF (singly innervated muscle fiber) motoneurons are those that form a large neuromuscular endplate in each muscle fiber with which they contact. Similarly, MIF (multiply innervated muscle fiber) motoneurons are those that form a chain of small synaptic contacts along the whole extension of the same muscle fiber. For the identification of the different types of motoneurons, a stimulation electrode was implanted at the level of the abducens nerve, which served to antidromically activate all the motoneurons of this nucleus (i.e., MIF and SIF), and a second stimulation electrode in the myotendinous junction of the lateral rectus muscle, in order to antidromically activate exclusively the MIF motoneurons. When a motoneuron was isolated electrophysiologically, a collision test was performed between the orthodromic spike (spontaneous) and the antidromic spike (induced after electrical stimulation) to determine the type of isolated motoneuron. SIF motoneurons were antidromically activated and collided only from the nerve electrode, whereas MIF motoneurons were activated and collided from both the nerve electrode and the one at the myotendinous junction. A first result that was observed between the two types of motoneurons was the different antidromic activation latency between MIF and SIF, which was measured as the time between the onset of the antidromic stimulus and the negative peak of the antidromic spike. Antidromic latencies showed higher values for MIF motor neurons than for SIF, indicative of a lower axonal conduction velocity in the former.

After the identification of each type of motoneuron, it was found that both types presented a tonic-phasic firing pattern, increasing their firing frequency for movements directed towards the recording site. However, important differences were found between both types of motoneurons. In general, the firing frequency of the MIF motoneurons was lower than that of the SIF, and they exhibited a lower frequency phasic signal. In short, MIF motoneurons had a lower sensitivity to ocular position (k) and velocity (r), as well as a lower recruitment threshold (Th), and a lower firing rate at straight ahead gaze, that is, when eye position = 0 degrees (F_0) with respect to SIF. Another electrophysiological difference between both types of cells was the latency between the maximum firing rate of the motoneuron during a saccadic movement and the maximum speed of the saccade, which turned out to be higher in SIF motoneurons compared to MIF. This result indicated that MIF

motoneurons would be more influential during the terminal phase of the saccade, while SIF motoneurons would play a more important role in generating the necessary force to initiate the eye movement.

The relationship between the parameters obtained from the combined analysis of the electrophysiological signal and the ocular position or velocity showed a strong significant positive correlation between the sensitivity to the position of the eye (k) and the recruitment threshold (Th). It also showed a significant positive correlation between the cell sensitivity to eye position (k) and sensitivity to eye velocity (r), for both MIF and SIF motoneurons. Last, we failed to find a correlation between r and Th for MIF or SIF motoneurons but the correlation was significant when both types of motoneurons were merged into a single group. So when all these parameters were represented together in a 3D graph, two separate groups of data could be readily distinguished from each other, although with some overlap between them: the group of MIF motoneurons, with lower k , r and Th , and the group of SIF, with higher k , r , and Th . Finally, when data from MIF and SIF motoneurons was considered as a single group it was demonstrated an inverse relationship between k and the antidromic activation latency, and between Th and the antidromic latency, that is, the higher the sensitivity and the recruitment threshold, the lower the antidromic activation latency.

All results described so far correspond to MIF and SIF motoneurons recorded during conjugated eye movements in the horizontal plane, but during disjunctive vergence eye movements it was observed that both MIF and SIF motoneurons can fire following four different profiles: appropriate, inappropriate, variable and nonresponding. MIF motoneurons mostly had an 'appropriate' profile during vergence movements, whereas SIF motoneurons had a 'variable' profile; motoneurons with 'inappropriate' or 'nonresponding' profile were usually a low number which did not distinguish between MIF and SIF motoneurons.

During eye movements induced by vestibular stimulation, both types showed a firing pattern that corresponded to the slow and fast phases of nystagmus, as long as the eye movement was in the ipsilateral direction. In this case, the sensitivities to position (k_v) and velocity (r_v) were calculated by means of a multiple regression analysis, which reflected lower values of both parameters for MIF motoneurons compared to SIF. However, the coefficients of determination (R^2) for k_v and r_v of MIF and SIF motoneurons were high and did not show differences between them.

For the study of the distribution of MIF and SIF motoneurons within the abducens nucleus, we specifically labeled retrogradely MIF motoneurons with rhodamine (injected into the myotendinous region of the lateral rectus muscle), and combined the retrograde labeling with the immunostaining against ChAT (acetylcholine transferase) that labels both SIF and MIF motoneurons. It was found that both types of cells distributed intermixed and without following any specific pattern within the nucleus. Likewise, with this labeling technique it could be observed that the MIF motoneurons had a significantly smaller size than that of the SIF, in congruence with the physiological data that showed higher latency of antidromic activation in the population of MIF motoneurons. Moreover, we quantified that MIF motoneurons represented 19% of the total number of motoneurons of the abducens nucleus. In relation to synaptic coverage, analyzed at the confocal microscopy level, MIF motoneurons showed a lower percentage of their somatic perimeter contacted by synaptic boutons, identified as synaptophysin-immunoreactive (excitatory and inhibitory synapses), and also by synaptic boutons of inhibitory nature, identified as VGAT-immunoreactive (inhibitory synapses), in comparison with SIF motoneurons, but the balance of inhibitory inputs with respect to total synapses was similar for both motoneuronal types.

DISCUSIÓN GLOBAL

DISCUSIÓN GLOBAL

Son muchos los trabajos de investigación que evidencian el importante papel neuroprotector que tiene el VEGF en diferentes tipos de daños neuronales (Azzouz y col., 2004; Tovar-y-Romo y col., 2010; Lange y col., 2016; Wang y col., 2016). Por esta razón nos propusimos profundizar en el conocimiento de los mecanismos que subyacen a este proceso de neuroprotección frente a la degeneración. En concreto, nos centramos en el estudio del estado funcional y morfológico en el que se encuentran las motoneuronas axotomizadas del NMOE que han sido tratadas con VEGF y VEGF-B. Creemos que nuestro estudio resulta de especial interés dado que no existen resultados previos descritos en relación a la fisiología de motoneuronas lesionadas y tratadas con VEGF. Para ello, se realizaron registros electrofisiológicos crónicos a diferentes tiempos: antes de la lesión (periodo control), durante la lesión y a lo largo del tratamiento de administración de VEGF o VEGF-B. Posteriormente, para el estudio morfológico, el tejido de animales que habían seguido los mismos protocolos experimentales, pero que no habían tenido registro electrofisiológico, se trató con técnicas de inmunocitoquímica a nivel de microscopía confocal, obteniéndose las imágenes con el marcaje específico para cada estudio (i.e., sinaptología, reacción astrocítica, vasculatura), que tras su análisis permitió la comparación de los resultados para cada situación experimental.

La presencia de los receptores de VEGF (VEGFR-1 y VEGFR-2) y de VEGF-B (VEGFR-1) ha sido demostrada previamente en motoneuronas espinales (Poesen y col., 2008; Tovar-y-Romo y col., 2010). Así que, esta fue la primera cuestión que nos planteamos en el primer artículo de este trabajo, ‘Synaptic loss and firing alterations in axotomized motoneurons are restored by vascular endothelial growth factor (VEGF) and VEGF-B’, ¿las motoneuronas del NMOE expresan VEGFR-1 y VEGFR-2? Tras el procesamiento de tejido control (i.e., sin ningún tipo de procedimiento de lesión), mediante técnicas de microscopía confocal y electrónica, se comprobó la presencia de los receptores VEGFR-1 y VEGFR-2 en el soma de las motoneuronas del NMOE, confirmando así su susceptibilidad a la unión de VEGF y VEGF-B y, consecuentemente, a sus efectos. También se demostró la presencia de ambos receptores en los axones de estas motoneuronas, y en la parte del axón de la unión neuromuscular del músculo al que inervan (i.e., el recto lateral). Finalmente se comprobó, como estaba descrito previamente en músculo (Hoier y Hellsten, 2014), que las fibras del músculo recto lateral contienen VEGF, lo que significa que puede ser transportado retrógradamente desde el músculo (Storkebaum y col., 2005) y actuar como molécula de

señalización entre este y las motoneuronas del NMOE. Es importante indicar que, en este primer artículo, el VEGF fue administrado a las motoneuronas axotomizadas de forma crónica a través del cabo proximal del nervio seccionado.

Respecto al papel que juega cada receptor, son interesantes los resultados fisiológicos obtenidos durante el periodo de administración del inhibidor de VEGFR-2 (SU1498). Trabajos previos atribuyen la mayoría de los efectos descritos para VEGF a su receptor VEGFR-2 (Storkebaum y col., 2005; Lambrechts y Carmeliet, 2006; Olsson y col., 2006), y aunque aún no se conoce bien el papel de VEGFR-1, sí se ha demostrado que también tiene funciones neuroprotectoras (Olsson y col., 2006; Poesen y col., 2008; Dhondt y col., 2011; Carmeliet y Ruiz de Almodovar, 2013). En este trabajo también se demuestra el papel de VEGFR-1 en la prevención de los efectos provocados por la axotomía en las motoneuronas del NMOE a través de su unión a VEGF-B. La administración de VEGF y VEGF-B siempre preservó el patrón de disparo de las motoneuronas lesionadas durante movimientos oculares espontáneos y vestibulares. Sin embargo, cuando se administró VEGF junto al inhibidor de VEGFR-2, se observaron alteraciones en el patrón de disparo durante movimientos oculares espontáneos, pero no durante los de origen vestibular. En este caso, VEGF estaba actuando a través de su unión a VEGFR-1. Estos resultados sugieren que cada tipo de receptor podría contribuir de diferente manera en el mantenimiento de las diferentes sinapsis aferentes (que son principalmente las neuronas reticulares de brote, las vestibulares y las del núcleo *prepositus hypoglossi*), teniendo mayor importancia VEGFR-1 en las aferencias procedentes del núcleo vestibular medial (que llevan la información para los movimientos oculares durante estimulación vestibular), pero siendo ambos receptores equivalentes en el mantenimiento de las aferencias que llevan la información para los movimientos oculares espontáneos (i.e., neuronas del núcleo *prepositus hypoglossi* y neuronas reticulares de brote). El papel de los distintos receptores del VEGF en la recuperación de las distintas entradas a las motoneuronas del NMOE axotomizadas se ilustra en la Figura 9.

Respecto a la fisiología de las motoneuronas del NMOE, estas muestran un patrón de disparo tónico-fásico que se corresponde con la posición y la velocidad ocular, respectivamente (Delgado-García y col., 1986). Estudios previos han descrito el comportamiento fisiológico de las motoneuronas axotomizadas del NMOE durante diferentes movimientos oculares, describiendo una caída en la tasa general de disparo que afecta a ambos componentes, durante movimientos oculares espontáneos y aquellos inducidos por estimulación vestibular. Además, las motoneuronas del NMOE axotomizadas

presentan un patrón de disparo irregular que no se mantiene durante fijaciones oculares prolongadas, mostrando bajos coeficientes de correlación en el cálculo de las sensibilidades a la posición y a la velocidad del ojo (Delgado-García y col., 1988; Davis-López de Carrizosa y col., 2009). Los datos del presente trabajo obtenidos en las motoneuronas del NMOE axotomizadas (no tratadas con VEGF) resultaron totalmente congruentes con estos trabajos previos (Delgado-García y col., 1988; Davis-López de Carrizosa y col., 2009).

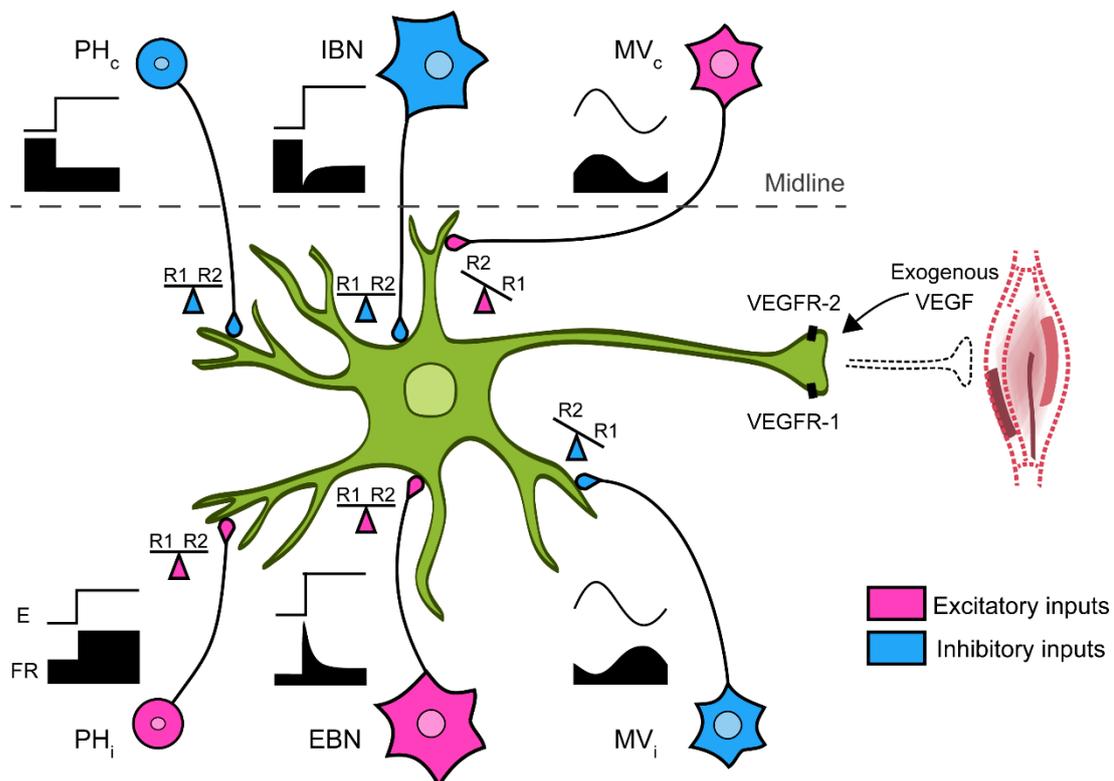


Figura 9. Esquema de las aferencias sinápticas de motoneuronas axotomizadas del NMOE tras la administración de VEGF. Las principales aferencias del NMOE son: (i) las neuronas del *prepositus hypoglossi* (PH), las cuales muestran un disparo tónico; (ii) las neuronas reticulares de brote inhibitorio (IBN) y excitador (EBN), que disparan durante sacádicos; y (iii) las neuronas del núcleo vestibular medial (MV), que llevan la señal vestibular durante movimientos oculares inducidos por estimulación vestibular. El papel que juega cada receptor, VEGFR-1 (R1) y VEGFR-2 (R2), en el mantenimiento de cada entrada sináptica se encuentra esquematizado en forma de balanza. E= posición ocular, FR= frecuencia de disparo, i= ipsilateral (i.e., homolateral), c= contralateral. Tomada de Calvo y col., 2018a.

En este primer artículo, ‘Synaptic loss and firing alterations in axotomized motoneurons are restored by vascular endothelial growth factor (VEGF) and VEGF-B’, se constata la prevención o la completa recuperación, en función del protocolo de administración, del patrón de disparo de las motoneuronas lesionadas tras la administración

de VEGF o VEGF-B, sin que se observe ninguna de las alteraciones inducidas por la axotomía. En estudios previos de nuestro grupo de investigación se administraron diferentes factores neurotróficos en este mismo modelo de axotomía (i.e., NGF, BDNF y NT-3), sin embargo, ninguno de ellos produjo una completa y/o correcta recuperación del patrón del disparo, así como de las aferencias sinápticas, en motoneuronas axotomizadas del NMOE (Davis-López de Carrizosa y col., 2009, 2010). Así, la administración de BDNF recuperó el componente tónico del disparo durante fijaciones oculares, pero no el fásico, mientras que NT-3 produjo efectos complementarios al BDNF, ya que recuperó el disparo fásico durante sacádicos, pero no el disparo tónico (Davis-López de Carrizosa y col., 2009). Por otro lado, la administración de NGF a las motoneuronas del NMOE axotomizadas recuperó el patrón de descarga tónico-fásico de estas células, pero indujo significativamente una mayor irregularidad en el disparo tónico, así como sensibilidades a la posición y a la velocidad ocular mayores que en las motoneuronas controles (Davis-López de Carrizosa y col., 2010). De entre los factores probados en nuestro modelo, por tanto, solo VEGF fue capaz de recuperar el disparo tónico-fásico de estas motoneuronas tras su axotomía hasta valores similares a los de las células control (véase Figura 10).

En cuestión de morfología, se ha demostrado que la axotomía produce una pérdida de contactos sinápticos, tanto alrededor del soma de las motoneuronas como en el neuropilo (i.e., compartimento dendrítico del núcleo) (Pastor y col., 2000; Navarro y col., 2007). Tras la administración de VEGF se pudo observar una recuperación de los contactos sinápticos excitadores e inhibidores en las motoneuronas axotomizadas y en el neuropilo, manteniendo un balance excitación/inhibición similar a la situación control. La axotomía también genera una reacción astrocítica alrededor de las motoneuronas (Ridet y col., 1997), esta hipertrofia glial generada está asociada a la pérdida de contactos sinápticos, de hecho, se ha constatado que las lamelas gliales se interponen entre los botones retraídos y la membrana postsináptica (Pastor y col., 2000). La administración de VEGF (Tovar-y-Romo y col., 2007), los implantes celulares (Benítez-Temiño y col., 2003) o la aplicación de otros factores neurotróficos (Davis-López de Carrizosa y col., 2009) ya demostraron previamente su capacidad para reducir la respuesta astrocítica tras la lesión, resultados que también se han obtenido en nuestro modelo de administración de VEGF.

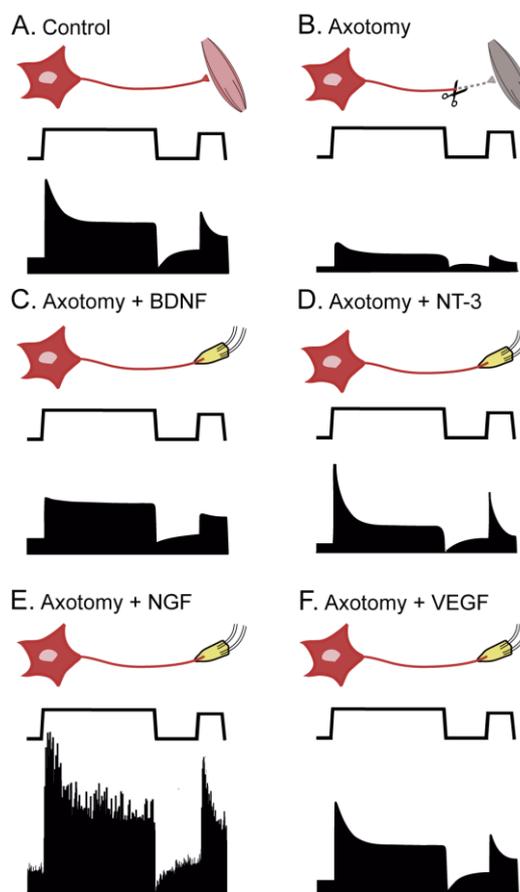


Figura 10. Esquema de los resultados obtenidos en el patrón de disparo tónico-fásico de motoneuronas axotomizadas del NMOE tras la administración de diferentes factores neurotróficos. La axotomía (B) produce una caída en ambos componentes del patrón de disparo respecto a la situación control (A). La administración de BDNF (C) recupera el disparo tónico, mientras que la de NT-3 (D) recupera el fásico. NGF (E) aumenta la tasa de disparo de ambos componentes y hace que el disparo sea más irregular. Solo la administración de VEGF (F) produce una recuperación del componente tónico-fásico y restituye los valores control. Tomada de Calvo y col., 2018b.

Dados los prometedores resultados obtenidos en la aplicación crónica de VEGF tras la lesión, nos propusimos usar un abordaje de administración del VEGF que resultara más fácilmente aplicable en el ámbito clínico. Con este objeto, en el trabajo: ‘A single intraventricular injection of VEGF leads to long-term neurotrophic effects in axotomized motoneurons’, procedimos a realizar la administración de VEGF en una única dosis a través del cuarto ventrículo. Tras esta única inyección, realizada en el mismo acto quirúrgico que la axotomía, se pudo observar que el patrón de disparo de las motoneuronas axotomizadas no sufría las alteraciones inducidas por la lesión, y que, además, este efecto preventivo en la fisiología se producía a largo plazo, al contrario de lo que se muestra en trabajos previos

llevados a cabo en este mismo modelo experimental, donde el cese de la administración crónica de diversos factores tróficos (BDNF, NT-3 y NGF), revierte los efectos de estos sobre el patrón de disparo y las motoneuronas vuelven a mostrar claros signos de lesión (Davis-López de Carrizosa y col., 2009, 2010). No obstante, existen trabajos donde con una única inyección de diferentes factores neurotróficos, como el factor neurotrófico derivado de la línea celular glial ('glial cell line-derived neurotrophin factor' o GDNF) (Yue y col., 2014), o el factor neurotrófico cerebral dopaminérgico ('cerebral dopamine neurotrophic factor' o CDNF) y el factor neurotrófico mesencefálico derivado de astrocitos ('mesencephalic astrocyte-derived neurotrophic factor' o MANF) (Voutilainen y col., 2009; Airavaara y col., 2012), se ha observado que se induce neuroprotección a largo plazo en modelos de rata con síndrome hemiparkinsoniano, e incluso en trabajos experimentales donde la administración de BDNF es transitoria se ha comprobado que es suficiente para mantener durante un largo plazo los axones regenerados en modelos de lesión espinal (Blesch y Tuszynski, 2007).

Respecto a la morfología, los resultados son parejos a los obtenidos en la administración crónica y, al igual que las propiedades fisiológicas no se ven alteradas en el protocolo de axotomía más dosis única de VEGF intracerebroventricular, la densidad de contactos sinápticos y astrocítica se mantiene similar a la situación control, no mostrando signos de lesión a largo plazo. Una posible explicación para los efectos prolongados en el tiempo descritos podría encontrarse en la capacidad de unión a heparina que tiene el VEGF, lo que le permite unirse fácilmente a la matriz extracelular durante largos periodos de tiempo, alargando así su actividad biológica (Krilleke y col., 2009).

Por último, en el artículo indicado, se realizó un estudio de la vasculatura del NMOE para comprobar si la dosis de VEGF usada en este experimento producía angiogénesis o alteraciones en la morfología de los vasos sanguíneos. Para ello se realizó un estudio morfométrico midiendo la densidad de vasos, su número y diámetro. En ninguno de estos parámetros se encontraron diferencias con respecto al tejido control. Así mismo, se observó que la axotomía tampoco afectó a la vasculatura del núcleo. Además, núcleos próximos al NMOE, como los núcleos vestibulares, tampoco sufrieron alteraciones tras la administración intracerebroventricular de VEGF en relación a sus vasos sanguíneos. Estos resultados sugieren que el VEGF ejercería sus funciones neuroprotectoras directamente sobre las motoneuronas activando determinadas rutas de señalización intracelulares, y no a través del

crecimiento de vasos que suplan de oxígeno y nutrientes a las células lesionadas, como también se ha propuesto.

Las motoneuronas del NMOE son de dos tipos, MIF o SIF, descritas en un principio según el tipo de fibra muscular que inervan y su patrón de inervación (Büttner-Ennever y col., 2001). En el trabajo ‘Functional diversity of motoneurons in the oculomotor system’, nos propusimos realizar una caracterización morfo-funcional de estas motoneuronas, con el fin de poder estudiar, más adelante, cómo se comportan ambos tipos frente a la axotomía y administración de VEGF.

Estudios previos, basados en las aferencias premotoras que recibe cada tipo de motoneurona, sugirieron que existiría una segregación funcional en el tipo de movimiento ocular que generan, estando las MIF involucradas en los movimientos oculares de fijación, y las SIF en los movimientos oculares rápidos, como los sacádicos o el reflejo vestibulo-ocular (Wasicky y col., 2004; Ugolini y col., 2006). Sin embargo, los resultados fisiológicos del presente trabajo (en el que se ha llevado a cabo por primera vez la identificación electrofisiológica diferencial de motoneuronas MIF o SIF), han demostrado que ambos tipos de motoneuronas participan en la generación de diversos tipos de movimientos oculares (i.e., fijaciones, sacádicos, reflejo vestibulo-ocular, vergencia), no existiendo tal diferenciación entre motoneuronas ‘tónicas’ y ‘fásicas’, de acuerdo con otros estudios fisiológicos previos de las motoneuronas del NMOE (Robinson, 1970; Delgado y col., 1986; Pastor y González-Forero, 2003).

Sin embargo, las diferencias encontradas en el patrón de disparo de las motoneuronas MIF y SIF sí podrían estar en concordancia con los estudios morfológicos arriba citados. Ambas motoneuronas presentaron un patrón de disparo tónico-fásico, pero las MIF dispararon a tasas menores durante los distintos tipos de movimientos oculares, y presentaron brotes de potenciales de acción durante los sacádicos ‘on’ de mucha menor frecuencia que las motoneuronas SIF. Por tanto, los valores de sensibilidad a la posición y a la velocidad ocular de las motoneuronas MIF fueron significativamente menores que los de las motoneuronas SIF. Lo mismo pasó con los valores de umbral de reclutamiento y de F_0 . Estos resultados sugieren que las MIF estarían implicadas en movimientos oculares que requieran pequeños cambios de tensión en el músculo, mientras que aquellos movimientos que requirieran grandes incrementos de tensión que, por otra parte, precisan de mayor fuerza, serían generados por motoneuronas SIF. De hecho, las motoneuronas MIF inervan fibras musculares que solo se contraen cuanto la estimulación es repetitiva, por lo que la tensión

generada dependerá de la frecuencia de estimulación (Meredith y Goldberg, 1986). Este dato justificaría su participación en el ajuste fino de los movimientos oculares.

El estudio morfológico realizado en este trabajo muestra, en concordancia con otros autores y especies usadas (Büttner-Ennever y col., 2001; Eberhorn y col., 2005; Bohlen y col., 2017), que las motoneuronas MIF tienen menor tamaño que las SIF, lo que explicaría su mayor latencia de activación antidrómica y su bajo umbral de reclutamiento, en comparación con las motoneuronas SIF. Un menor tamaño celular implicaría una mayor resistencia de membrana y, por tanto, mayor sería la excitabilidad ante una determinada cantidad de corriente sináptica dada. Esto podría explicar los valores bajos de umbral de reclutamiento que se encontraron en las motoneuronas MIF frente a las SIF. Respecto a los contactos sinápticos, la densidad de aferencias a las motoneuronas SIF fue significativamente mayor que a las motoneuronas MIF, lo que podría explicar su mayor tasa de disparo y mayores sensibilidades oculares, ya que recibirían más impulsos sinápticos. En el presente trabajo se ha mostrado que el tipo de aferencias (excitadoras *versus* inhibitorias) que recibe cada tipo de motoneurona fue cualitativamente el mismo, si bien lo reciben en diferente proporción, pero mostrando un balance de botones inhibitorios/excitadores similar entre ambos tipos motoneuronales. Por último, se estudió la distribución de las motoneuronas MIF y SIF dentro del núcleo NMOE y no se encontró segregación anatómica, esto es, ambos tipos de motoneuronas aparecieron entremezcladas, al contrario de lo que muestran otros trabajos en otras especies distintas al gato, en los que se sitúan a las motoneuronas MIF en zonas periféricas del núcleo, aunque en la rata no es tan evidente como en primates (Büttner-Ennever y col., 2001; Eberhorn y col., 2005; Erichsen y col., 2014). En la Figura 11 se presenta una ilustración, a modo de resumen, comparando las propiedades morfofuncionales de las motoneuronas MIF con las de las SIF obtenidas en el presente trabajo.

Con el fin de determinar si ambos tipos de motoneuronas respondieron de forma similar o diferencial al tratamiento con VEGF tras la axotomía, utilizamos un criterio matemático para poderlas diferenciar, dado que en los experimentos de axotomía y administración del factor, el procedimiento de lesión del sexto par craneal en la órbita implicó necesariamente la extirpación del músculo recto lateral. Por tanto, nos fue imposible identificar mediante métodos electrofisiológicos a las motoneuronas MIF frente a las SIF. Sin embargo, dado que los valores de sensibilidad a la posición ocular (k , en espigas/segundo/grado) y los valores de umbral de reclutamiento (Th , en grados) fueron significativamente menores en las motoneuronas MIF que en las SIF, separamos los

extremos de las poblaciones motoneuronales registradas en los distintos procedimientos de administración de VEGF en base a estas propiedades fisiológicas (anexo AI). Los resultados que se obtuvieron mostraron que las (posibles) motoneuronas MIF axotomizadas y tratadas con VEGF presentaron valores de k similares al control. Los mismos resultados se obtuvieron con las (posibles) motoneuronas SIF, esto es, que los valores de k tras la axotomía+VEGF fueron similares a los controles. Con lo que estos datos indicaron que ambos tipos motoneuronales se recuperaron de los efectos de la axotomía tras la administración del VEGF en los distintos procedimientos usados. También hay que destacar que, comparando todos los distintos grupos experimentales entre sí (incluyendo las motoneuronas controles y las tratadas), las únicas diferencias significativas que se obtuvieron fueron en relación a los valores de k de las motoneuronas MIF, frente a los de las SIF (independientemente del tratamiento), siendo menores en las primeras, en congruencia con nuestro trabajo ‘Functional diversity of motoneurons in the oculomotor system’.

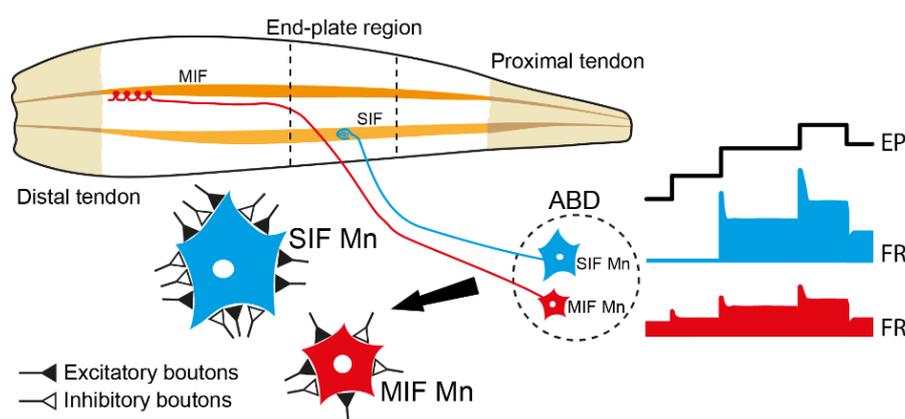


Figura 11. Esquema de las propiedades morfofuncionales de las motoneuronas MIF y SIF. Las motoneuronas MIF (MIF Mn) tienen menor (i) frecuencia de disparo (FR), (ii) sensibilidad a la posición (EP) y la velocidad ocular, (iii) frecuencia en los brotes de disparo durante sacádicos en la dirección de activación, (iv) umbral de reclutamiento, (v) tamaño de soma y (vi) cantidad de contactos sinápticos que las motoneuronas SIF (SIF Mn). Ambas participan en todos los tipos de movimientos oculares estudiados y muestran similar ratio de botones sinápticos excitatorios/inhibitorios. SIF Mn inervan fibras SIF, con uniones neuromusculares *en plaque* en la zona ‘end-plate’, mientras que MIF Mn lo hacen a lo largo de las fibras MIF con uniones *en grappe*. Adaptada de Hernández y col., 2019.

Finalmente, quisimos comprobar si existían diferencias entre las motoneuronas MIF y SIF del NMOE en relación a su contenido en factores neurotróficos, en concreto, los 4 factores utilizados en nuestro modelo experimental: BDNF y NT-3 (Davis-López de Carrizosa y col., 2009), NGF (Davis-López de Carrizosa y col., 2010) y VEGF (presente

trabajo) que pudieran, de alguna manera, correlacionar con las diferencias fisiológicas que se encontraron entre ambos tipos motoneuronales en el trabajo 'Functional diversity of motoneurons in the oculomotor system'. Las motoneuronas MIF se identificaron retrógradamente tras la inyección de rodamina en la unión miotendinosa del músculo recto lateral. El marcaje retrógrado se combinó con inmunocitoquímica doble frente a ChAT y frente a cada uno de los 4 factores neurotróficos mencionados. Las motoneuronas MIF se identificaron porque fueron la únicas en presentar el doble marcaje rodamina+ChAT. Tal y como se presenta en el anexo II, no se encontraron diferencias significativas en la densidad óptica para ninguno de los 4 factores neurotróficos entre las motoneuronas MIF y SIF. Por lo tanto, los datos obtenidos sugieren que las diferencias morfofisiológicas entre ambos tipos motoneuronales no tienen como base un diferente soporte neurotrófico desde las fibras musculares MIF o SIF.

CONCLUSIONES FINALES

CONCLUSIONES FINALES

A partir de los resultados obtenidos en los trabajos presentados, se exponen las siguientes conclusiones sobre las motoneuronas del núcleo del motor ocular externo:

PRIMERA. La administración exógena de VEGF y VEGF-B en el momento de la axotomía (protocolo de administración inmediata), y realizada de forma continuada a través del nervio seccionado, previene completamente las alteraciones, tanto en el patrón de disparo como en la sinaptología aferente, de las motoneuronas lesionadas.

SEGUNDA. Tras un periodo de axotomía (protocolo de administración tardía), la administración exógena continuada de VEGF a través del nervio seccionado, conduce a la recuperación de la actividad fisiológica y de los contactos sinápticos de las motoneuronas lesionadas, a la vez que no se observa la reacción astrocítica inducida por la axotomía.

TERCERA. La administración exógena de una sola dosis de VEGF, realizada a través del cuarto ventrículo en el momento en que se produce la sección del nervio, previene a largo plazo, tanto las alteraciones fisiológicas y sinápticas de las motoneuronas lesionadas, así como la respuesta astrocítica inducida por la lesión.

CUARTA. El tratamiento con una sola dosis intracerebroventricular de VEGF no induce alteraciones en el sistema vascular del núcleo del motor ocular externo, ni en núcleos cercanos, lo que significa que el VEGF ejerce sus efectos en las motoneuronas lesionadas de forma directa.

QUINTA. Los receptores VEGFR-1 y VEGFR-2 están presentes en el soma de las motoneuronas, en sus axones y en el axón presináptico de la unión neuromuscular. Además, las fibras musculares del recto lateral expresan VEGF. Todo ello evidencia la existencia de un transporte retrógrado trófico de VEGF desde el músculo.

SEXTA. El bloqueo de VEGFR-2, junto con la administración de VEGF a las motoneuronas lesionadas, evita la completa recuperación de las propiedades fisiológicas durante movimientos oculares espontáneos, pero no afecta a la recuperación en el patrón de disparo durante el reflejo vestibulo-ocular. Se demuestra así la acción trófica diferencial de ambos receptores sobre distintos tipos de aferencias sinápticas.

SÉPTIMA. Las motoneuronas MIF y SIF presentan un patrón de disparo similar, sin que exista segregación fisiológica basada en el tipo de movimiento ocular. Su distribución topográfica en el núcleo indica que tampoco existe segregación anatómica.

OCTAVA. Las motoneuronas MIF representan una clase motoneuronal que se diferencia de las motoneuronas SIF por su menor frecuencia de disparo, sensibilidades neuronales, umbral de reclutamiento, tamaño somático y densidad de contactos sinápticos.

NOVENA. Tanto las motoneuronas MIF como SIF presentan una inmunorreactividad somática similar de BDNF, NT-3, NGF y VEGF en el cerebro adulto. Por tanto, el contenido en cualquiera de estos factores no puede explicar las diferencias morfofisiológicas entre ambos tipos de motoneurona.

DÉCIMA Y ÚLTIMA. Las conclusiones aquí expuestas permiten formular la siguiente tesis: ‘el VEGF es el único factor demostrado hasta el momento que previene y rescata a las motoneuronas oculomotoras axotomizadas de los cambios morfofisiológicos inducidos por la lesión’.

FINAL CONCLUSIONS

FINAL CONCLUSIONS

From the results obtained in the papers of the present work, the following conclusions are formulated about the motoneurons of the abducens nucleus:

FIRST. The exogenous administration of VEGF and VEGF-B at the time of axotomy (immediate administration protocol), carried out chronically through the sectioned nerve, completely prevents the alterations, both in the firing pattern and in the afferent synaptology, of the injured motoneurons.

SECOND. After a period of axotomy (delayed administration protocol), the chronic exogenous administration of VEGF through the sectioned nerve leads to the recovery of the physiological activity and synaptic contacts of injured motoneurons. Furthermore, the astrocytic reaction induced by the axotomy is not observed.

THIRD. The exogenous administration of a single dose of VEGF performed through the fourth ventricle at the time of the nerve section prevents, in the long term, both the physiological and synaptic alterations of the axotomized motoneurons, as well as the astrocytic response induced by injury.

FOURTH. The treatment with a single intracerebroventricular dose of VEGF does not induce alterations in the vascular system of abducens nucleus, or in nearby nuclei, which means that VEGF acts directly on injured motoneurons.

FIFTH. VEGFR-1 and VEGFR-2 receptors are present in the motoneuron soma, their axons, and their presynaptic terminals at the neuromuscular junction. In addition, the muscle fibers of the lateral rectus muscle express VEGF. These results evidence the existence of a trophic retrograde transport of VEGF from the muscle.

SIXTH. VEGFR-2 blockade simultaneously with VEGF delivery to injured motoneurons, prevents the recovery of the firing pattern of axotomized motoneurons during spontaneous eye movements, but not during the vestibulo-ocular reflex. Thus, it is demonstrated the distinct trophic action of each receptor on different types of synaptic afferents.

SEVENTH. MIF and SIF motoneurons show a similar firing pattern, with no physiological segregation based on the type of eye movement. Their topographic distribution within the nucleus also indicates that there is no anatomical segregation.

EIGHTH. MIF motoneurons represent a motoneuronal class that differs from SIF motoneurons by their lower firing frequency, neuronal sensitivities, recruitment threshold, somatic size, and density of synaptic contacts.

NINTH. Both MIF and SIF motoneurons exhibit similar somatic immunoreactivity to BDNF, NT-3, NGF, and VEGF in the adult brain. Therefore, the relative content of any of these factors cannot explain the morphophysiological differences between both types of motoneuron.

TENTH AND LAST. The conclusions exposed here allow the formulation of the following thesis: 'VEGF is the only factor demonstrated to date that prevents and rescues axotomized oculomotor motoneurons from the morphophysiological changes induced by injury'.

BIBLIOGRAFÍA

BIBLIOGRAFÍA

- Aase K., Lymboussaki A., Kaipainen A., Olofsson B., Alitalo K., Eriksson U. Localization of VEGF-B in the mouse embryo suggests a paracrine role of the growth factor in the developing vasculature. *Dev. Dyn.* 215: 12-25, 1999.
- Agarwala S., Kalil R. E. Axotomy-induced neuronal death and reactive astrogliosis in the lateral geniculate nucleus following a lesion of the visual cortex in the rat. *J. Comp. Neurol.* 392: 252-263, 1998.
- Airavaara M., Harvey B.K., Voutilainen M.H., Shen H., Chou J., Lindholm P., Lindahl M., Tuominen R.K., Saarma M., Hoffer B., Wang Y. CDNF protects the nigrostriatal dopamine system and promotes recovery after MPTP treatment in mice. *Cell Transplant.* 21: 1213–1223, 2012.
- Akagi Y. The localization of the motor neurons innervating the extraocular muscles in the oculomotor nuclei of the cat and rabbit, using horseradish peroxidase. *J. Comp. Neurol.* 181: 745-761, 1978.
- Alvarado-Mallart R. M., Pinçon-Raymond M. The palisade endings of cat extraocular muscles: a light and electron microscope study. *Tissue Cell* 11: 567-584, 1979.
- Arany Z., Huang L. E., Eckner R., Bhattacharya S., Jiang C., Goldberg M. A., Bunn H. F., Livingston D. M. An essential role for p300/CBP in the cellular response to hypoxia. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 93: 12969-12973, 1996.
- Autiero M., Lutun A., Tjwa M., Carmeliet P. Placental growth factor and its receptor, vascular endothelial growth factor receptor-1: novel targets for stimulation of ischemic tissue revascularization and inhibition of angiogenic and inflammatory disorders. *J. Thromb. Haemost.* 1: 1356-1370, 2003.
- Azzouz M., Ralph G.S., Storkebaum E., Walmsley L.E., Mitrophanous K.A., Kingsman S.M., Carmeliet P., Mazarakis N.D. VEGF delivery with retrogradely transported lentivector prolongs survival in a mouse ALS model. *Nature* 429: 413-417, 2004.
- Bahill A. T., Stark L. The trajectories of saccadic eye movements. *Sci. Am.* 240: 108-117, 1979.
- Baker R., Delgado-García J. M., McCrea R. A. Morphological and physiological effects of axotomy on cat abducens motoneurons. En: *Lesion-Induced Neuronal Plasticity in Sensorimotor Systems. Proceedings in Life Sciences* (Flohr H., Pretch W., eds.) pp. 51-63. Springer-Verlag, Berlin, 1981.

- Barbas-Henry H. A., Lohman A. H. The motor nuclei and sensory neurons of the IIIrd, IVth, and VIth cranial nerves in the monitor lizard, *Varanus exanthematicus*. *J. Comp. Neurol.* 267: 370-386, 1988.
- Becker W., Fuchs A. F. Further properties of the human saccadic system: eye movements and correction saccades with and without visual fixation points. *Vision Res.* 9: 1247-1258, 1969.
- Becker W. The neurobiology of saccadic eye movements. *Metrics. Rev. Oculomot. Res.* 3:13-67, 1989.
- Bellomo D., Headrick J. P., Silins G. U., Paterson C. A., Thomas P. S., Gartside M., Mould A., Cahill M. M., Tonks I. D., Grimmond S. M., Townson S., Wells C., Little M., Cummings M. C., Hayward N. K., Kay G. F. Mice lacking the vascular endothelial growth factor-B gene (*Vegfb*) have smaller hearts, dysfunctional coronary vasculature, and impaired recovery from cardiac ischemia. *Circ. Res.* 86: E29-35, 2000.
- Benítez-Temiño B., de la Cruz R.R., Pastor A.M. Grafting of a new target prevents synapse loss in abducens internuclear neurons induced by axotomy. *Neuroscience* 118: 611–626, 2003.
- Billig I., Buisseret-Delmas C., Buisseret P. Identification of nerve endings in cat extraocular muscles. *Anat. Rec.* 248: 566-575, 1997.
- Blanks R. H., Estes M. S., Markham C. H. Physiologic characteristics of vestibular first-order canal neurons in the adult cat. II. Response to constant angular acceleration. *J. Neurophysiol.* 38: 1250-1268, 1975.
- Blesch A., Tuszynski M.H. Transient growth factor delivery sustains regenerated axons after spinal cord injury. *J. Neurosci.* 27: 10535–10545, 2007.
- Blumer R., Lukas J. R., Aigner M., Bittner R., Baumgartner I., Mayr R. Fine structural analysis of extraocular muscle spindles of a two-year-old human infant. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 40: 55-64, 1999.
- Blumer R., Lukas J. R., Wasicky R., Mayr R. Presence and morphological variability of Golgi tendon organs in the distal portion of sheep extraocular muscle. *Anat. Rec.* 258: 359–368, 2000.
- Blumer R., Konakci K. Z., Brugger P. C., Blumer M. J. F, Moser D., Schoefer C., Lukas J. R., Streicher J. Muscle spindles and Golgi tendon organs in bovine calf extraocular muscle studied by means of double-fluorescent labeling, electron

- microscopy, and three-dimensional reconstruction. *Exp. Eye Res.* 77: 447–462, 2003.
- Blumer R., Konacki K. Z., Streicher J., Hoetzenecker W., Blumer M. J., Lukas J. R. Proprioception in the extraocular muscles of mammals and man. *Strabismus* 14: 101-106, 2006.
- Blumer R., Maurer-Gesek B., Gesslbauer B., Blumer M., Pechriggl E., Davis-López de Carrizosa M. A, Horn A. K., May P. J., Streicher J., de la Cruz R. R., Pastor Á. M. Palisade Endings Are a Constant Feature in the Extraocular Muscles of Frontal-Eyed, But Not Lateral-Eyed, Animals. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 57: 320-331, 2016.
- Blumer R., Streicher J., Davis-López de Carrizosa M. A., de la Cruz R. R., Pastor A. M. Palisade Endings of Extraocular Muscles Develop Postnatally Following Different Time Courses. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 58: 5105-5121, 2017.
- Bogaert E., Van Damme P., Poesen K., Dhondt J., Hersmus N., Kiraly D., Scheveneels W., Robberecht W., Van Den Bosch L. VEGF protects motor neurons against excitotoxicity by upregulation of GluR2. *Neurobiol. Aging* 31: 2185-2191, 2011.
- Bohlen M. O., Warren S., May P. J. A central mesencephalic reticular formation projection to medial rectus motoneurons supplying singly and multiply innervated extraocular muscle fibers. *J. Comp. Neurol.* 525: 2000-2018, 2017a.
- Bohlen M.O., Warren S., Mustari M. J., May P. J. Examination of feline extraocular motoneuron pools as a function of muscle fiber innervation type and muscle layer. *J. Comp. Neurol.* 525: 919–935, 2017b.
- Boyle R., Büttner U., Markert G. Vestibular nuclei activity and eye movements in the alert monkey during sinusoidal optokinetic stimulation. *Exp. Brain Res.* 57: 362-369, 1985.
- Brännström T., Havton L., Kellerth J. O. Changes in size and dendritic arborization patterns of adult cat spinal alpha-motoneurons following permanent axotomy. *J. Comp. Neurol.* 318: 439-451, 1992.
- Büttner U., Kremmyda O. Smooth pursuit eye movements and optokinetic nystagmus, En: *Neuro-ophthalmology neuronal control of eye movements. Developments in Ophthalmology*, vol. 40 (Straube A., Büttner U., eds) pp. 76-89. Karger, Basel, 2007.
- Büttner-Ennever J. A., Grob P., Akert K., Bizzini B. (1981) A transsynaptic autoradiographic study of the pathways controlling the extraocular eye muscles,

- using [125I]B-IIb tetanus toxin fragment. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 374: 157-170, 1981.
- Büttner-Ennever J. A., Cohen B., Pause M., Fries W. Raphe nucleus of the pons containing omnipause neurons of the oculomotor system in the monkey, and its homologue in man. *J. Comp. Neurol.* 267: 307-321, 1988.
- Büttner-Ennever J. A., Horn A. K., Scherberger H., D'Ascanio P. Motoneurons of twitch and nontwitch extraocular muscle fibers in the abducens, trochlear, and oculomotor nuclei of monkeys. *J. Comp. Neurol.* 24: 318-335, 2001.
- Büttner-Ennever J. A., Horn A. K. Oculomotor system: a dual innervation of the eye muscles from the abducens, trochlear, and oculomotor nuclei. *Mov. Disord.* 17 Suppl 2: S2-3, 2002.
- Büttner-Ennever J. A., Eberhorn A., Horn A. K. Motor and sensory innervation of extraocular eye muscles. *Ann. NY Acad. Sci.* 1004: 40-49, 2003.
- Büttner-Ennever J. A. The extraocular motor nuclei: organization and functional neuroanatomy. *Prog. Brain Res.* 151: 95-125, 2006.
- Calvo P. M., de la Cruz R. R., Pastor A. M. Synaptic loss and firing alterations in Axotomized Motoneurons are restored by vascular endothelial growth factor (VEGF) and VEGF-B. *Exp. Neurol.* 304: 67-81, 2018a.
- Calvo P. M., Pastor A. M., de la Cruz R. R. Vascular endothelial growth factor: an essential neurotrophic factor for motoneurons? *Neural Regen. Res.* 13: 1181-1182, 2018b.
- Calvo P. M., de la Cruz R. R., Pastor A. M. A Single Intraventricular Injection of VEGF Leads to Long-Term Neurotrophic Effects in Axotomized Motoneurons. *eNeuro.* 7: ENEURO.0467-19, 2020.
- Cannon S. C., Robinson D. A. Loss of the neural integrator of the oculomotor system from brain stem lesion on monkey. *J. Neurophysiol.* 57: 1383-1409, 1987.
- Cao, Z. VEGF-Mediated vascular functions in death and disease. Doctoral Thesis. Linköping University, 2015.
- Carleton S. C., Carpenter M. B. Afferent and efferent connections of the medial, inferior and lateral vestibular nuclei in the cat and monkey. *Brain Res.* 278: 29-51, 1983.
- Carmeliet P., Ruiz de Almodovar C. VEGF ligands and receptors: implications in neurodevelopment and neurodegeneration. *Cell. Mol. Life Sci.* 70: 1763–1778, 2013.

- Chen R., Lee C., Lin X., Zhao C., Li X. Novel function of VEGF-B as an antioxidant and therapeutic implications. *Pharmacol. Res.* 143: 33-39, 2019.
- Cohen B., Suzuki J. I., Bender M. B. Eye movements from semicircular canal nerve stimulation in the cat. *Ann. Otol. Rhinol. Laryngol.* 73: 153-69, 1964.
- Cohen B., Matsuo V., Raphan T. Quantitative analysis of the velocity characteristics of optokinetic nystagmus and optokinetic after-nystagmus. *J. Physiol.* 270: 321-344, 1977.
- Collewijn H. Latency and gain of the rabbit's optokinetic reactions to small movements. *Brain Res.* 36: 59-70, 1972.
- Collewijn H. The oculomotor system of the rabbit and its plasticity. Springer-Verlag, Berlín, 1981.
- Collins C. C., O'Meara D., Scott A. B. Muscle tension during unrestrained human eye movements. *J. Physiol.* 245: 351-369, 1975.
- Conner J. M., Lauterborn J. C., Gall C. M. Anterograde transport of neurotrophin proteins in the CNS--a reassessment of the neurotrophic hypothesis. *Rev. Neurosci.* 9: 91-103, 1998
- Connolly D. T., Olander J. V., Heuvelman D., Nelson R., Monsell R., Siegel N., Haymore B. L., Leimgruber R., Feder J. Human vascular permeability factor. Isolation from U937 cells. *J. Biol. Chem.* 25: 20017-20024, 1989.
- Coubard A. O. Saccade and vergence eye movements: a review of motor and premotor commands. *Eur. J. Neurosci.* 38: 3384-3397, 2013.
- Davies A. M. Paracrine and autocrine actions of neurotrophic factors. *Neurochem. Res.* 21: 749-753, 1996.
- Davis-López de Carrizosa M. A., Morado-Díaz C. J., Tena J. J., Benítez-Temiño B., Pecero M. L., Morcuende S. R., de la Cruz R. R., Pastor A. M. Complementary actions of BDNF and neurotrophin-3 on the firing patterns and synaptic composition of motoneurons. *J. Neurosci.* 29: 575-587, 2009.
- Davis-López de Carrizosa M. A., Morado-Díaz C. J., Morcuende S., de la Cruz R. R., Pastor A. M. Nerve growth factor regulates the firing patterns and synaptic composition of motoneurons. *J. Neurosci.* 30: 8308-8319, 2010.
- de la Cruz R. R., Pastor A. M., Martínez-Guijarro F. J., López-García C., Delgado-García J. M. Localization of parvalbumin, calretinin, and calbindin D-28k in identified extraocular motoneurons and internuclear neurons of the cat. *J. Comp. Neurol.* 390: 377-391, 1998.

- de la Cruz R. R., Pastor A. M., Martínez-Guijarro F. J., López-García C., Delgado-García J. M. Role of GABA in the extraocular motor nuclei of the cat: a postembedding immunocytochemical study. *Neuroscience* 51: 911-929, 1992.
- Delgado-García J. M., del Pozo F., Baker R. Behavior of neurons in the abducens nucleus of the alert cat-I. Motoneurons. *Neuroscience* 17: 929–952, 1986a.
- Delgado-García J. M., del Pozo F., Baker R. Behavior of neurons in the abducens nucleus of the alert cat-II. Internuclear neurons. *Neuroscience* 17: 953-973, 1986b.
- Delgado-García J. M., Del Pozo F., Spencer R.F., Baker R. (1988) Behavior of neurons in the abducens nucleus of the alert cat--III. Axotomized motoneurons. *Neuroscience* 24:143-160, 1988.
- Delgado-García J. M., Vidal P. P., Gómez C., Berthoz A. A neurophysiological study of prepositus hypoglossi neurons projecting to oculomotor and preoculomotor nuclei in the alert cat. *Neuroscience* 29: 291-307, 1989.
- Demer J. L., Oh S. Y., Poukens V. Evidence for active control of rectus extraocular muscle pulleys. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 41: 1280–1290, 2000.
- Destombes J., Rouvière A. Ultrastructural study of vestibular and reticular projections to the abducens nucleus. *Exp. Brain Res.* 43: 253-260, 1981.
- Dichgans J., Schmidt C. L., Graf W. (1973) Visual input improves the speedometer function of the vestibular nuclei in the goldfish. *Exp. Brain Res.* 18: 319-322, 1973.
- Distler C., Mustari M. J., Hoffmann K. P. Cortical projections to the nucleus of the optic tract and dorsal terminal nucleus and to the dorsolateral pontine nucleus in macaques: a dual retrograde tracing study. *J. Comp. Neurol.* 444: 144-158, 2002.
- Dodge J. C., Treleaven C. M., Fidler J. A., Hester M., Haidet A., Handy C., Rao M., Eagle A., Matthews J. C., Taksir T. V., Cheng S. H., Shihabuddin L. S., Kaspar B. K. AAV4-mediated expression of IGF-1 and VEGF within cellular components of the ventricular system improves survival outcome in familial ALS mice. *Mol. Ther.* 18: 2075-2084, 2010.
- Dor Y., Porat R., Keshet E. Vascular endothelial growth factor and vascular adjustments to perturbations in oxygen homeostasis. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 280: C1367-1374, 2001.
- Dhondt J., Peeraer E., Verheyen A., Nuydens R., Buyschaert I., Poesen K., Van Geyte K., Beerens M., Shibuya M., Haigh J. J., Meert T., Carmeliet, P., Lambrechts D. Neuronal FLT1 receptor and its selective ligand VEGF-B protect against retrograde degeneration of sensory neurons. *FASEB J.* 25: 1461–1473, 2011.

- Eberhorn A. C., Ardeleanu P., Büttner-Ennever J. A., Horn A. K. Histochemical differences between motoneurons supplying multiply and singly innervated extraocular muscle fibers. *J. Comp. Neurol.* 491: 352–366, 2005.
- Ebos J. M., Bocci G., Man S., Thorpe P. E., Hicklin D. J., Zhou D., Jia X., Kerbel R. S. A naturally occurring soluble form of vascular endothelial growth factor receptor 2 detected in mouse and human plasma. *Mol. Cancer Res.* 2: 315-326, 2004.
- Eichmann A., Makinen T., Alitalo K. Neural guidance molecules regulate vascular remodeling and vessel navigation. *Genes Dev.* 19: 1013-1021, 2005.
- Erichsen J. T., Wright N. F., May P. J. Morphology and ultrastructure of medial rectus subgroup motoneurons in the macaque monkey. *J. Comp. Neurol.* 522: 626–641, 2014.
- Escudero M., Delgado-García J. M. Behavior of reticular, vestibular and prepositus neurons terminating in the abducens nucleus of the alert cat. *Exp. Brain Res.* 71: 218-722, 1988.
- Escudero M., de la Cruz R. R., Delgado-García J. M. A physiological study of vestibular and prepositus hypoglossi neurones projecting to the abducens nucleus in the alert cat. *J. Physiol.* 458: 539-560, 1992.
- Fernández C., Goldberg J. M., Abend W. K. Response to static tilts of peripheral neurons innervating otolith organs of the squirrel monkey. *J. Neurophysiol.* 35: 978-987, 1972.
- Ferrara N., Henzel W. J. Pituitary follicular cells secrete a novel heparin-binding growth factor specific for vascular endothelial cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 15: 851-858, 1989.
- Ferrara N., Chen H., Davis-Smyth T., Gerber H. P., Nguyen T. N., Peers D., Chisholm V., Hillan K. J., Schwall R. H. Vascular endothelial growth factor is essential for corpus luteum angiogenesis. *Nat. Med.* 4: 336-340, 1998.
- Ferrara N. Vascular endothelial growth factor: basic science and clinical progress. *Endocr. Rev.* 25: 581-611, 2004.
- Fischer C., Mazzone M., Jonckx B., Carmeliet P. FLT1 and its ligands VEGFB and PlGF: drug targets for anti-angiogenic therapy? *Nat. Rev. Cancer.* 8: 942-956, 2008.
- Fong G. H., Rossant J., Gertsenstein M., Breitman M. L. Role of the Flt-1 receptor tyrosine kinase in regulating the assembly of vascular endothelium. *Nature* 376: 66-70, 1995.

- Forstreuter F., Lucius R., Mentlein R. Vascular endothelial growth factor induces chemotaxis and proliferation of microglial cells. *J. Neuroimmunol.* 132: 93-98, 2002.
- Friedburg C., Allen C. P., Mason P.J., Lamb T.D. Contribution of cone photoreceptors and post-receptor mechanisms to the human photopic electroretinogram. *J. Physiol.* 556: 819-834, 2004.
- Fuchs A. F., Kaneko C. R., Scudder C. A. Brainstem control of saccadic eye movements. *Annu. Rev. Neurosci.* 8: 307-337, 1985.
- Fuh G., Garcia K. C., de Vos A. M. The interaction of neuropilin-1 with vascular endothelial growth factor and its receptor flt-1. *J. Biol. Chem.* 275: 26690-26695, 2000.
- Fujisawa H., Kitsukawa T. Receptors for collapsin/semaphorins. *Curr. Opin. Neurobiol.* 8: 587-592, 1998.
- Garbuzova-Davis S., Rodrigues M. C., Hernandez-Ontiveros D. G., Louis M. K., Willing A. E., Borlongan C. V., Sanberg P. R. Amyotrophic lateral sclerosis: a neurovascular disease. *Brain Res.* 1398: 113-125, 2011.
- García Hernández R. Dependencias tróficas y sinápticas del sistema oculomotor. Doctoral Thesis. Universidad de Sevilla, 2018.
- Gerber H. P., McMurtrey A., Kowalski J., Yan M., Keyt B. A., Dixit V., Ferrara N. Vascular endothelial growth factor regulates endothelial cell survival through the phosphatidylinositol 3'-kinase/Akt signal transduction pathway. Requirement for Flk-1/KDR activation. *J. Biol. Chem.* 273: 30336-30343, 1998.
- Giolli R. A., Blanks R., Lui F. The accessory optic system: basic organization with an update on connectivity, neurochemistry, and function. En: *Neuroanatomy of the oculomotor system.* Ed. Büttner-Ennervet, J. A. Elsevier, Amsterdam, pp. 407-440, 2006.
- Glicksman M. A. Localization of motoneurons controlling the extraocular muscles of the rat. *Brain Res.* 188: 53-62, 1980.
- Gluzman-Poltorak Z., Cohen T., Shibuya M., Neufeld G. Vascular endothelial growth factor receptor-1 and neuropilin-2 form complexes. *J. Biol. Chem.* 276: 18688-18694, 2001.
- Goldberg J. M., Fernández C. Physiology of peripheral neurons innervating semicircular canals of the squirrel monkey. I. Resting discharge and response to constant angular accelerations. *J. Neurophysiol.* 34: 635-660, 1971.

- Gonshor A., Melvill-Jones G. Extreme vestibulo-ocular adaptation induced by prolonged optical reversal of vision. *J. Physiol.* 256: 381-414, 1976.
- González Forero D. Deaferentación neuronal reversible en el sistema nervioso central adulto inducida por neurotoxina tetánica. Doctoral Thesis. Universidad Pablo de Olavide, 2002.
- Graf W., Brunken W. J. Elasmobranch oculomotor organization: anatomical and theoretical aspects of the phylogenetic development of vestibulo-oculomotor connectivity. *J. Comp. Neurol.* 227: 569-581, 1984.
- Grantyn A., Berthoz A. Reticulo-spinal neurons participating in the control of synergic eye and head movements during orienting in the cat. I. Behavioral properties. *Exp. Brain Res.* 66: 339-354, 1987.
- Grimmond S., Lagercrantz J., Drinkwater C., Silins G., Townson S., Pollock P., Gotley D., Carson E., Rakar S., Nordenskjöld M., Ward L., Hayward N., Weber G. Cloning and characterization of a novel human gene related to vascular endothelial growth factor. *Genome Res.* 6: 124-131, 1996.
- Hammarberg H., Piehl F., Risling M., Cullheim S. Differential regulation of trophic factor receptor mRNAs in spinal motoneurons after sciatic nerve transection and ventral root avulsion in the rat. *J. Comp. Neurol.* 426: 587-601, 2000.
- Harker D. W. The structure and innervation of sheep superior rectus and levator palpebrae extraocular muscles. II. Muscle spindles. *Invest. Ophthalmol.* 11: 970-979, 1972.
- Harris C. M., Wolpert D. M. The main sequence of saccades optimizes speed-accuracy trade-off. *Biol. Cybern.* 95: 21-29, 2006.
- Hernández R. G., Calvo P. M., Blumer R., de la Cruz R. R., Pastor A. M. Functional diversity of motoneurons in the oculomotor system. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 116: 3837-3846, 2019.
- Hess A., Pilar G. Slow fibers of the extraocular muscles of the cat. *J. Physiol.* 169: 780-798, 1963.
- Highstein S. M., Baker R. Excitatory termination of abducens internuclear neurons on medial rectus motoneurons: relationship to syndrome of internuclear ophthalmoplegia. *J. Neurophysiol.* 41: 1647-1661, 1978.
- Hikosaka O., Kawakami T. Inhibitory reticular neurons related to the quick phase of vestibular nystagmus--their location and projection. *Exp. Brain Res.* 27: 377-386, 1977.

- Hiratsuka S., Minowa O., Kuno J., Noda T., Shibuya M. Flt-1 lacking the tyrosine kinase domain is sufficient for normal development and angiogenesis in mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 95: 9349-9354, 1998.
- Hoier B., Hellsten Y. Exercise-induced capillary growth in human skeletal muscle and the dynamics of VEGF. *Microcirculation* 21: 301–314, 2014.
- Huber G. C. Sensory nerve terminations in the tendons of the extrinsic eye-muscles of the cat. *J. Comp. Neurol.* 10: 152-158, 1990.
- Hunt C. C. Mammalian muscle spindle: Peripheral Mechanisms. *Physiol. Rev.* 70: 643–663, 1990.
- Ide C., Kato S. Peripheral nerve regeneration. *Neurosci. Res. Suppl.* 13: S157-164, 1990.
- Igusa Y., Sasaki S., Shimazu H. Excitatory premotor burst neurons in the cat pontine reticular formation related to the quick phase of vestibular nystagmus. *Brain Res.* 182: 451-456, 1980.
- Ito M. Topographical representation of vestibulo-ocular reflexes in rabbit cerebellar flocculus. *Neuroscience* 7: 1657-1664, 1982.
- James J. M., Gewolb C., Bautch V. L. Neurovascular development uses VEGF-A signaling to regulate blood vessel ingression into the neural tube. *Development* 136: 833-841, 2009.
- Jin K., Zhu Y., Sun Y., Mao X. O., Xie L., Greenberg D. A. Vascular endothelial growth factor (VEGF) stimulates neurogenesis in vitro and in vivo. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 99: 11946-11950, 2002.
- Junqueira de Azevedo I. L., Farsky S. H., Oliveira M. L., Ho P. L. Molecular cloning and expression of a functional snake venom vascular endothelium growth factor (VEGF) from the Bothrops insularis pit viper. A new member of the VEGF family of proteins. *J. Biol. Chem.* 276: 39836-39842, 2001.
- Kawakami A., Kitsukawa T., Takagi S., Fujisawa H. Developmentally regulated expression of a cell surface protein, neuropilin, in the mouse nervous system. *J. Neurobiol.* 29: 1-17, 1996.
- Keck P. J., Hauser S. D., Krivi G., Sanzo K., Warren T., Feder J., Connolly D. T. Vascular permeability factor, an endothelial cell mitogen related to PDGF. *Science* 246: 1309-1312, 1989.
- Koch S., Claesson-Welsh L. Signal transduction by vascular endothelial growth factor receptors. *Cold Spring Harb. Perspect. Med.* 2: a006502, 2012.

- Kokaia Z., Bengzon J., Metsis M., Kokaia M., Persson H., Lindvall O. Coexpression of neurotrophins and their receptors in neurons of the central nervous system. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 15: 6711-6715, 1993.
- Konakci K. Z., Streicher J., Hoetzenecker W., Blumer M. J., Lukas J. R., Blumer R. Molecular characteristics suggest an effector function of palisade endings in extraocular muscles. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 46: 155–165, 2005.
- Kono R., Poukens V., Demer J. L. Superior oblique muscle layers in monkeys and humans. *Invest Ophthalmol. Vis. Sci.* 46: 2790–2799, 2005.
- Krauzlis R. J. The control of voluntary eye movements: new perspectives. *Neuroscientist* 11: 124-137, 2005.
- Krilleke D., Ng Y. S., Shima D. T. The heparin-binding domain confers diverse functions of VEGF-A in development and disease: a structure-function study. *Biochem. Soc. Trans.* 37: 1201–1206, 2009.
- Lambrechts D. et al. VEGF is a modifier of amyotrophic lateral sclerosis in mice and humans and protects motoneurons against ischemic death. *Nat. Genet.* 34: 383-94, 2003.
- Lambrechts D., Carmeliet P. VEGF at the neurovascular interface: therapeutic implications for motor neuron disease. *Biochim. Biophys. Acta* 1762: 1109–1121, 2006.
- Lambrechts D. et al. Meta-analysis of vascular endothelial growth factor variations in amyotrophic lateral sclerosis: increased susceptibility in male carriers of the -2578AA genotype. *J. Med. Genet.* 46: 840-846, 2009.
- Lange C., Storkebaum E., de Almodóvar C. R., Dewerchin M., Carmeliet P. Vascular endothelial growth factor: a neurovascular target in neurological diseases. *Nat. Rev. Neurol.* 12: 439-454, 2016.
- Langer T. P., Kaneko C. R., Scudder C. A., Fuchs A. F. Afferents to the abducens nucleus in the monkey and cat. *J. Comp. Neurol.* 245: 379–400, 1986.
- Le Bras B. et al. VEGF-C is a trophic factor for neural progenitors in the vertebrate embryonic brain. *Nat. Neurosci.* 9: 340-348, 2006.
- Leblond C. S., Kaneb H. M., Dion P. A., Rouleau G. A. Dissection of genetic factors associated with amyotrophic lateral sclerosis. *Exp. Neurol.* 262: 91-101, 2014.
- Leung D. W., Cachianes G., Kuang W. J., Goeddel D. V., Ferrara N. Vascular endothelial growth factor is a secreted angiogenic mitogen. *Science* 246: 1306-1309, 1989.

- Levi-Montalcini R. (1982) Developmental neurobiology and the natural history of nerve growth factor. *Annu. Rev. Neurosci.* 5: 341-362, 1982.
- Li Y. et al. VEGF-B inhibits apoptosis via VEGFR-1-mediated suppression of the expression of BH3-only protein genes in mice and rats. *J. Clin. Invest.* 118: 913-923, 2008.
- Li X., Lee C., Tang Z., Zhang F., Arjunan P., Li Y., Hou X., Kumar A., Dong L. VEGF-B: a survival, or an angiogenic factor? *Cell Adh. Migr.* 3: 322-327, 2009.
- Li X., Kumar A., Zhang F., Lee C., Tang Z. Complicated life, complicated VEGF-B. *Trends Mol. Med.* 18: 119-127, 2012.
- Licht T., Keshet E. Delineating multiple functions of VEGF-A in the adult brain. *Cell Mol. Life Sci.* 70: 1727-1737, 2013.
- Lieberman A. R. The axon reaction: a review of the principal features of perikaryal responses to axon injury. *Int. Rev. Neurobiol.* 114: 49-124, 1971.
- Lienbacher K., Mustari M., Ying H. S., Büttner-Ennever J. A., Horn A. K. Do palisade endings in extraocular muscles arise from neurons in the motor nuclei? *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 52: 2510-2519, 2011a.
- Lienbacher K., Mustari M., Hess B., Büttner-Ennever J., Horn A. K. Is there any sense in the Palisade endings of eye muscles? *Ann. N Y Acad. Sci.* 1233: 1-7, 2011b.
- Lisberger S. G., Morris E. J., Tychsen L. Visual motion processing and sensory-motor integration for smooth pursuit eye movements. *Annu. Rev. Neurosci.* 10: 97-129, 1987.
- Lladó J., Tolosa L., Olmos G. Cellular and molecular mechanisms involved in the neuroprotective effects of VEGF on motoneurons. *Front. Cell Neurosci.* 7: 181, 2013.
- Lorente de Nó R. VESTIBULO-OCULAR REFLEX ARC. *Arch. NeurPsych.* 30: 245–291, 1933.
- Lorente de Nó R. Analysis of the activity of the chains of internuncial neurons. *J. Neurophysiol.* 1: 207-244, 1938.
- Löwenstein O., Sand A. The individual and integrated activity of the semicircular canals of the elasmobranch labyrinth. *J. Physiol.* 99: 89-101, 1940.
- Lu L., Zheng L., Viera L., Suswam E., Li Y., Li X., Estévez A. G., King P. H. Mutant Cu/Zn-superoxide dismutase associated with amyotrophic lateral sclerosis destabilizes vascular endothelial growth factor mRNA and downregulates its expression. *J. Neurosci.* 27:7929-7938, 2007.

- Lukas J. R., Aigner M., Blumer R., Heinzl H., Mayr R. Number and distribution of neuromuscular spindles in human extraocular muscles. *Invest. Ophthalmol.* 35: 4317–4327, 1994.
- Lukas J. R., Blumer R., Denk M., Baumgartner I., Neuhuber W., Mayr R. Innervated myotendinous cylinders in human extraocular muscles. *Invest. Ophthalm. Vis. Sci.* 41: 2422–2431, 2000.
- Mackenzie F., Ruhrberg C. Diverse roles for VEGF-A in the nervous system. *Development* 139: 1371-1380, 2012.
- Mahran Z. Y, Sakla F. B. The pattern of innervation of the extrinsic ocular muscles and the intra-orbital ganglia of the albino mouse. *Anat. Rec.* 152: 173-183, 1965.
- Maier A., DeSantis M., Eldred E. The occurrence of muscle spindles in extraocular muscles of various vertebrates. *J. Morph.* 143: 397–408, 1974.
- Maru Y., Yamaguchi S., Shibuya M. Flt-1, a receptor for vascular endothelial growth factor, has transforming and morphogenic potentials. *Oncogene* 16: 2585-2595, 1998.
- McCrea R. A., Baker R., Delgado-Garcia J. Afferent and efferent organization of the prepositus hypoglossi nucleus. *Prog. Brain Res.* 50: 653-665, 1979.
- McCrea R. A., Yoshida K., Berthoz A., Baker R. Eye movement related activity and morphology of second order vestibular neurons terminating in the cat abducens nucleus. *Exp Brain Res.* 40: 468-473, 1980.
- McCrea R. A., Baker R. Anatomical connections of the nucleus prepositus of the cat. *J. Comp. Neurol.* 237: 377-407, 1985.
- McCrea R. A., Strassman A., Highstein S. M. Morphology and physiology of abducens motoneurons and internuclear neurons intracellularly injected with horseradish peroxidase in alert squirrel monkey. *J. Comp. Neurol.* 243: 291–308, 1986.
- McCrea R. A., Strassman A., May E., Highstein S.M. Anatomical and physiological characteristics of vestibular neurons mediating the horizontal vestibulo-ocular reflex of the squirrel monkey. *J. Comp. Neurol.* 264: 547-570, 1987.
- Meredith M. A., Goldberg S. J. Contractile differences between muscle units in the medial rectus and lateral rectus muscles in the cat. *J. Neurophysiol.* 56: 50–56, 1986.
- Meyer M., Clauss M., Lepple-Wienhues A., Waltenberger J., Augustin H. G., Ziche M., Lanz C., Büttner M., Rziha H. J., Dehio C. A novel vascular endothelial growth factor encoded by Orf virus, VEGF-E, mediates angiogenesis via signalling through

- VEGFR-2 (KDR) but not VEGFR-1 (Flt-1) receptor tyrosine kinases. *EMBO J.* 18: 363-74, 1999.
- Miles F. A., Eighmy B. B. Long-term adaptive changes in primate vestibuloocular reflex. I. Behavioral observations. *J. Neurophysiol.* 43: 1406-1425, 1980.
- Miller J. M., Robins D. Extraocular muscle forces in alert monkey. *Vision Res.* 32: 1099-1113, 1992.
- Miranda R. C., Sohrabji F., Toran-Allerand C. D. Neuronal colocalization of mRNAs for neurotrophins and their receptors in the developing central nervous system suggests a potential for autocrine interactions. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 15: 6439-6443, 1993.
- Miyazaki S. Location of motoneurons in the oculomotor nucleus and the course of their axons in the oculomotor nerve. *Brain Res.* 348: 57-63, 1985.
- Morris E. J., Lisberger S. G. Different responses to small visual errors during initiation and maintenance of smooth-pursuit eye movements in monkeys. *J. Neurophysiol.* 58: 1351-1369, 1987.
- Murphy E. H., Garone M., Tashayyod D., Baker R. B. Innervation of extraocular muscles in the rabbit. *J. Comp. Neurol.* 254: 78-90, 1986.
- Mustari M. J., Fuchs A. F., Kaneko C. R., Robinson F. R. Anatomical connections of the primate pretectal nucleus of the optic tract. *J. Comp. Neurol.* 349: 111-128, 1994.
- Nagy J. A., Vasile E., Feng D., Sundberg C., Brown L. F., Detmar M. J., Lawitts J. A., Benjamin L., Tan X., Manseau E. J., Dvorak A. M., Dvorak H. F. Vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor induces lymphangiogenesis as well as angiogenesis. *J. Exp. Med.* 196: 1497-506, 2002.
- Naito H., Tanimura K. I., Taga N., Hosoya Y. Microelectrode study on the subnuclei of the oculomotor nucleus in the cat. *Brain Res.* 81: 215-231, 1974.
- Nash A. D., Baca M., Wright C., Scotney P. D. The biology of vascular endothelial growth factor-B (VEGF-B). *Pulm. Pharmacol. Ther.* 19: 61-69, 2006.
- Navarro X., Vivó M., Valero-Cabré A. Neural plasticity after peripheral nerve injury and regeneration. *Prog. Neurobiol.* 82: 163-201, 2007.
- Ogunshola O. O., Antic A., Donoghue M. J., Fan S. Y., Kim H., Stewart W. B., Madri J. A., Ment L. R. Paracrine and autocrine functions of neuronal vascular endothelial growth factor (VEGF) in the central nervous system. *J. Biol. Chem.* 277: 11410-11415, 2002.

- Ohki Y., Shimazu H., Suzuki I. Excitatory input to burst neurons from the labyrinth and its mediating pathway in the cat: location and functional characteristics of burster-driving neurons. *Exp. Brain Res.* 72: 457-472, 1988.
- Olofsson B., Pajusola K., von Euler G., Chilov D., Alitalo K., Eriksson U. Genomic organization of the mouse and human genes for vascular endothelial growth factor B (VEGF-B) and characterization of a second splice isoform. *J. Biol. Chem.* 271: 19310-19317, 1996a.
- Olofsson B., Pajusola K., Kaipainen A., von Euler G., Joukov V., Saksela O., Orpana A., Pettersson R. F., Alitalo K., Eriksson U. Vascular endothelial growth factor B, a novel growth factor for endothelial cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 93: 2576-2581, 1996b.
- Olsson A. K., Dimberg A., Kreuger J., Claesson-Welsh L. VEGF receptor signaling in control of vascular function. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 7: 359–371, 2006.
- Ono S., Das V. E., Economides J. R., Mustari M. J. Modeling of smooth pursuit-related neuronal responses in the DLPN and NRTP of the rhesus macaque. *J. Neurophysiol.* 93: 108-116, 2005.
- Oosthuysen B. et al. Deletion of the hypoxia-response element in the vascular endothelial growth factor promoter causes motor neuron degeneration. *Nat. Genet.* 28: 131-138, 2001.
- Pastor A. M., de la Cruz R. R., Baker R. Characterization and adaptive modification of the goldfish vestibuloocular reflex by sinusoidal and velocity step vestibular stimulation. *J. Neurophysiol.* 68: 2003-2015, 1992.
- Pastor A. M., Delgado-García J. M., Martínez-Guijarro F. J., López-García C., de la Cruz R. R., Response of abducens internuclear neurons to axotomy in the adult cat. *J. Comp. Neurol.* 427: 370–390, 2000.
- Pastor A. M., González-Forero D. Recruitment order of cat abducens motoneurons and internuclear neurons. *J. Neurophysiol.* 90: 2240–2252, 2003.
- Peters O. M., Ghasemi M., Brown R. H. Jr. Emerging mechanisms of molecular pathology in ALS. *J. Clin. Invest.* 125: 2548, 2015.
- Poesen K. et al. Novel role for vascular endothelial growth factor (VEGF) receptor-1 and its ligand VEGF-B in motor neuron degeneration. *J. Neurosci.* 28: 10451-10459, 2008.

- Popovici C., Isnardon D., Birnbaum D., Roubin R. Caenorhabditis elegans receptors related to mammalian vascular endothelial growth factor receptors are expressed in neural cells. *Neurosci. Lett.* 2002 329: 116-120, 2002.
- Porter J. D., Baker R. S., Ragusa R. J., Brueckner J. K. Extraocular muscles: basic and clinical aspects of structure and function. *Surv. Ophthalmol.* 39: 451-484, 1995.
- Purves D., Lichtman J. W. Elimination of synapses in the developing nervous system. *Science* 10: 153-157, 1980.
- Purves D. *Body and Brain. A Trophic Theory of Neural Connections.* Harvard University Press, 1988.
- Quaegebeur A., Lange C., Carmeliet P. The neurovascular link in health and disease: molecular mechanisms and therapeutic implications. *Neuron* 71: 406-424, 2011.
- Ramon y Cajal S. *Degeneration and regeneration of the nervous system.* Clarendon Press, 1928
- Richmond F. J. R., Johnston W. S. W., Baker R. S., Steinbach M. J. Palisade endings in human extraocular muscle. *Invest Ophthal. Mol. Vis. Sci.* 25: 471-476, 1984.
- Ridet J. L., Malhotra S. K., Privat A., Gage F. H. Reactive astrocytes: cellular and molecular cues to biological function. *Trends Neurosci.* 20: 570-577, 1997.
- Ristimäki A., Narko K., Enholm B., Joukov V., Alitalo K. Proinflammatory cytokines regulate expression of the lymphatic endothelial mitogen vascular endothelial growth factor-C. *J. Biol. Chem.* 273: 8413-8418, 1998.
- Robberecht W., Philips T. The changing scene of amyotrophic lateral sclerosis. *Nat. Rev. Neurosci.* 14: 248-264, 2013.
- Robinson D. A. The mechanics of human smooth pursuit eye movement. *J. Physiol.* 180: 569-591, 1965.
- Robinson D. A. Eye movements evoked by collicular stimulation in the alert monkey. *Vision Res.* 12: 1795-808, 1972.
- Robinson D. A. The use of control systems analysis in the neurophysiology of eye movements. *Annu. Rev. Neurosci.* 4: 463-503, 1981.
- Ruiz de Almodovar C., Lambrechts D., Mazzone M., Carmeliet P. Role and therapeutic potential of VEGF in the nervous system. *Physiol. Rev.* 89: 607-648, 2009.
- Ruskell G. L. The fine structure of innervated myotendinous cylinders in extraocular muscles of rhesus monkeys. *J Neurocytol.* 7: 693-708, 1978.
- Ruskell G. L. The incidence and variety of Golgi tendon organs in extraocular muscles of the rhesus monkey. *J. Neurocytol.* 8: 639-653, 1979.

- Ruskell G. L. The fine structure of human extraocular muscle spindles and their potential proprioceptive capacity. *J. Anat.* 167: 199-214, 1989.
- Ruskell G. L. Golgi tendon organs in the proximal tendon of sheep extraocular muscles. *Anat. Rec.* 227: 25-31, 1990.
- Ruskell G. L. Extraocular muscle proprioceptors and proprioception. *Prog. Retin. Eye Res.* 18: 269-291, 1999.
- Sasaki S. Alterations of the blood-spinal cord barrier in sporadic amyotrophic lateral sclerosis. *Neuropathology* 35: 518-528, 2015.
- Schairer J. O., Bennett M. V. L. Changes in gain of the vestibulo-ocular reflex induced by combined visual and vestibular stimulation in goldfish. *Brain Res.* 373: 164-176, 1986.
- Semenza G. L. Expression of hypoxia-inducible factor 1: mechanisms and consequences. *Biochem. Pharmacol.* 59: 47-53, 2000.
- Senger D. R., Galli S. J., Dvorak A. M., Perruzzi C. A., Harvey V. S., Dvorak H. F. Tumor cells secrete a vascular permeability factor that promotes accumulation of ascites fluid. *Science* 25: 983-985, 1983.
- Sevel D. The origins and insertions of the extraocular muscles: development, histologic features, and clinical significance. *Trans. Am. Ophthalmol. Soc.* 84: 488-526, 1986.
- Shaw M. D., Alley K. E. Generation of the ocular motor nuclei and their cell types in the rabbit. *J. Comp. Neurol.* 200: 69-82, 1981.
- Shaw M. D., Baker R. Direct projection from vestibular nuclei to facial nucleus in cats. *J Neurophysiol.* 50: 1265-1280, 1983.
- Shalaby F., Rossant J., Yamaguchi T. P., Gertsenstein M., Wu X. F., Breitman M. L., Schuh A. C. Failure of blood-island formation and vasculogenesis in Flk-1-deficient mice. *Nature* 376: 62-66, 1995.
- Shall M. S., Goldberg S. J. Extraocular motor units: type classification and motoneuron stimulation frequency-muscle unit force relationship. *Brain Res.* 587: 291-300, 1992.
- Sherrington C. S. Observations on the sensual role of the proprioceptive nerve-supply of the extrinsic ocular muscles. *Brain* 41: 332-343, 1918.
- Soh E. Y., Sobhi S. A., Wong M. G., Meng Y. G., Siperstein A. E., Clark O. H., Duh Q. Y. Thyroid-stimulating hormone promotes the secretion of vascular endothelial growth factor in thyroid cancer cell lines. *Surgery* 120: 944-947, 1996.

- Siegel G. J., Chauhan N. B. Neurotrophic factors in Alzheimer's and Parkinson's disease brain. *Brain. Res. Brain Res. Rev.* 33: 199-227, 2000.
- Simpson J. I. The accessory optic system. *Annu. Rev. Neurosci.* 7: 13-41, 1984.
- Simpson J. I., Giolli R. A., Blanks R. H. The pretectal nuclear complex and the accessory optic system. *Rev. Oculomot. Res.* 2: 335-364, 1988.
- Sodi A., Corsi M., Faussone Pellegrini M. S., Salvi G. Fine structure of the receptors at the myotendinous junction of human extraocular muscles. *Histol. Histopathol.* 3: 103-113, 1988.
- Spencer R. F., Porter J. D. Innervation and structure of extraocular muscles in the monkey in comparison to those of the cat. *J. Comp. Neurol.* 198: 649-665, 1981.
- Spencer R. F., Porter J. D. Biological organization of the extraocular muscles. En: *Neuroanatomy of the Oculomotor System, Progress in Brain Research*, vol. 151 (Büttner-Ennever J. A., ed) pp. 43-80. Elsevier, Amsterdam, 2006.
- Sperry R. W. Neural basis of the spontaneous optokinetic response produced by visual inversion. *J. Comp. Physiol. Psychol.* 43: 482-489, 1950
- Stein I., Neeman M., Shweiki D., Itin A., Keshet E. Stabilization of vascular endothelial growth factor mRNA by hypoxia and hypoglycemia and coregulation with other ischemia-induced genes. *Mol. Cell Biol.* 15: 5363-5368, 1995.
- Storkebaum E., Lambrechts D., Carmeliet P. VEGF: once regarded as a specific angiogenic factor, now implicated in neuroprotection. *Bioessays* 26: 943-954, 2004.
- Storkebaum E. et al. Treatment of motoneuron degeneration by intracerebroventricular delivery of VEGF in a rat model of ALS. *Nat. Neurosci.* 8: 85-92, 2005.
- Storkebaum E. et al. Impaired autonomic regulation of resistance arteries in mice with low vascular endothelial growth factor or upon vascular endothelial growth factor trap delivery. *Circulation* 122: 273-281, 2010.
- Strassman A., Highstein S. M., McCrea R. A. Anatomy and physiology of saccadic burst neurons in the alert squirrel monkey. I. Excitatory burst neurons. *J. Comp. Neurol.* 249: 337-357, 1986a.
- Strassman A., Highstein S. M., McCrea R. A. Anatomy and physiology of saccadic burst neurons in the alert squirrel monkey. II. Inhibitory burst neurons. *J. Comp. Neurol.* 249: 358-380, 1986b.
- Takahashi H., Shibuya M. The vascular endothelial growth factor (VEGF)/VEGF receptor system and its role under physiological and pathological conditions. *Clin. Sci. (Lond).* 109: 227-241, 2005.

- Takashima S., Kitakaze M., Asakura M., Asanuma H., Sanada S., Tashiro F., Niwa H., Miyazaki Ji J., Hirota S., Kitamura Y., Kitsukawa T., Fujisawa H., Klagsbrun M., Hori M. Targeting of both mouse neuropilin-1 and neuropilin-2 genes severely impairs developmental yolk sac and embryonic angiogenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 99: 3657-3662, 2002.
- Tetzlaff W., Kobayashi N. R., Giehl K. M. G., Tsui B. J., Cassar S. L., Bedard A. M. Response of rubrospinal and corticospinal neurons to injury and neurotrophins. En: *Progress in Brain Research*, vol. 103 (Seil F. J. ed.) pp. 271-289. Elsevier, Portland, 1994.
- Tischer E., Mitchell R., Hartman T., Silva M., Gospodarowicz D., Fiddes J. C., Abraham J. A. The human gene for vascular endothelial growth factor. Multiple protein forms are encoded through alternative exon splicing. *J. Biol. Chem.* 266: 11947-11954, 1991.
- Tovar-y-Romo L. B., Zepeda A., Tapia R. Vascular endothelial growth factor prevents paralysis and motoneuron death in a rat model of excitotoxic spinal cord neurodegeneration. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 66: 913–922, 2007.
- Tovar-Y-Romo L. B., Tapia R. VEGF protects spinal motor neurons against chronic excitotoxic degeneration in vivo by activation of PI3-K pathway and inhibition of p38MAPK. *J. Neurochem.* 115: 1090-1101, 2010.
- Ugolini G., Klam F., Doldan Dans M., Dubayle D., Brandi A. M., Büttner-Ennever J., Graf W. Horizontal eye movement networks in primates as revealed by retrograde transneuronal transfer of rabies virus: Differences in monosynaptic input to “slow” and “fast” abducens motoneurons. *J. Comp. Neurol.* 498: 762–785, 2006.
- Vincenti V., Cassano C., Rocchi M., Persico G. Assignment of the vascular endothelial growth factor gene to human chromosome 6p21.3. *Circulation* 93: 1493-1495, 1996.
- von Bartheld C. S., Byers M. R., Williams R., Bothwell M. Anterograde transport of neurotrophins and axodendritic transfer in the developing visual system. *Nature* 9: 830-833, 1996.
- Voutilainen M. H., Bäck S., Pörsti E., Toppinen L., Lindgren L., Lindholm P., Peränen J., Saarma M., Tuominen R. K. Mesencephalic astrocyte-derived neurotrophic factor is neurorestorative in rat model of Parkinson's disease. *J. Neurosci.* 29: 9651-9659, 2009.
- Walls G. L. The evolutionary history of eye movements. *Vision Res.* 2: 69-80, 1962.

- Wang Y., Duan W., Wang W., Di Wen, Liu Y., Liu Y., Li Z., Hu H, Lin H., Cui C., Li D., Dong H., Li C. scAAV9-VEGF prolongs the survival of transgenic ALS mice by promoting activation of M2 microglia and the PI3K/Akt pathway. *Brain Res.* 1648: 1-10, 2016.
- Wasicky R., Ziya-Ghazvini F., Blumer R., Lukas J. R., Mayr R. Muscle fiber types of human extraocular muscles: a histochemical and immunohistochemical study. *Invest. Ophthalmol. Visual Sci.* 41: 980–990, 2000.
- Wasicky R., Horn A. K., Büttner-Ennever J. A. Twitch and nontwitch motoneuron subgroups in the oculomotor nucleus of monkeys receive different afferent projections. *J. Comp. Neurol.* 479: 117–129, 2004.
- Westheimer G., McKee S. P. Visual acuity in the presence of retinal image motion. *J. Opt. Soc. Am.* 65: 847-850, 1975.
- Yuan L., Moyon D., Pardanaud L., Bréant C., Karkkainen M. J., Alitalo K., Eichmann A. Abnormal lymphatic vessel development in neuropilin 2 mutant mice. *Development* 129: 4797-4806, 2002.
- Yue X., Hariri D. J., Caballero B., Zhang S., Bartlett M. J., Kaut O., Mount D. W., Wüllner U., Sherman S. J., Falk T. Comparative study of the neurotrophic effects elicited by VEGF-B and GDNF in preclinical in vivo models of Parkinson's disease. *Neuroscience* 31: 385-400, 2014.
- Zacchigna S., Lambrechts D., Carmeliet P. Neurovascular signalling defects in neurodegeneration. *Nat. Rev. Neurosci.* 9: 169-181, 2008.
- Zelená J., Soukup T. The development of Golgi tendon organs. *J. Neurocytol.* 6: 171-194, 1977.
- Zhao Z., Nelson A. R., Betsholtz C., Zlokovic B. V. Establishment and Dysfunction of the Blood-Brain Barrier. *Cell* 163: 1064-1078, 2015.
- Zimmermann L., May P. J., Pastor A. M., Streicher J., Blumer R. Evidence that the extraocular motor nuclei innervate monkey palisade endings. *Neurosci. Lett.* 489: 89-93, 2011.
- Zimmermann L., Morado-Díaz C. J., Davis-López de Carrizosa M. A., de la Cruz R. R., May P. J., Streicher J., Pastor A. M., Blumer R. Axons giving rise to the palisade endings of feline extraocular muscles display motor features. *J. Neurosci.* 33: 2784-2793, 2013.