



**"ESTUDIO DE LA SUPERVIVENCIA DE LAS MOTONEURONAS DEL
NUCLEO DEL VI PAR CRANEAL DE LA RATA TRAS LA
ADMINISTRACION DE TOXINA BOTULINICA Y DOXORRUBICINA
EN EL MUSCULO RECTO LATERAL"**

**Laboratorio de Oftalmología Experimental
Dpto. de Oftalmología, Otorrinolaringología y Anatomía Patológica
Universidad de Murcia**

1996

UNIVERSIDAD DE MURCIA



1151434



**Memoria presentada en la Universidad de Murcia
para optar al grado de Doctor en Medicina**

10 MAYO 1996

Ana María Gómez Ramírez





UNIVERSIDAD DE MURCIA
DPTO. DE OFTALMOLOGIA, OTORRINOLARINGOLOGIA
Y ANATOMIA PATOLOGICA

LABORATORIO DE OFTALMOLOGIA EXPERIMENTAL
FACULTAD DE MEDICINA
30100 ESPINARDO - MURCIA - ESPAÑA
Teléf.: 34 68 36 39 61 - Fax: 34 68 36 39 62
E. Mail OFMMV01 @ FCU. UM. ES

D. JAIME MIRALLES DE IMPERIAL, CATEDRÁTICO DE OFTALMOLOGÍA DE
LA UNIVERSIDAD DE MURCIA,

CERTIFICA:

Que la Tesis Doctoral presentada por D^a. Ana María Gómez Ramírez, titulada:
"ESTUDIO DE LA SUPERVIVENCIA DE LAS MOTONEURONAS DEL NÚCLEO
DEL VI PAR CRANEAL DE LA RATA TRAS LA ADMINISTRACION DE TOXINA
BOTULÍNICA Y DOXORRUBICINA EN EL MÚSCULO RECTO LATERAL", ha sido
realizada bajo mi dirección y tutela en el Laboratorio de Oftalmología Experimental del
Departamento de Oftalmología, Otorrinolaringología y Anatomía Patológica de la
Facultad de Medicina de la Universidad de Murcia, y reúne todos los requisitos para optar
al grado de Doctor.

Y para que así conste a los efectos oportunos, firmo la presente en Murcia, a ocho
de Mayo de mil novecientos noventa y seis.

Fdo: Prof. D. Jaime Miralles de Imperial.

10 MAYO 1996



UNIVERSIDAD DE
MURCIA





UNIVERSIDAD DE MURCIA
DPTO. DE OFTALMOLOGIA, OTORRINOLARINGOLOGIA
Y ANATOMIA PATOLOGICA

LABORATORIO DE OFTALMOLOGIA EXPERIMENTAL
FACULTAD DE MEDICINA
30100 ESPINARDO - MURCIA - ESPAÑA
Teléf.: 34 68 36 39 61 - Fax: 34 68 36 39 62
E. Mail OFMMV01 @ FCU. UM. ES

D. MANUEL VIDAL SANZ, COLABORADOR CIENTÍFICO DEL CONSEJO
SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS,

CERTIFICA:

Que la Tesis Doctoral presentada por D^a. Ana María Gómez Ramírez, titulada:
"ESTUDIO DE LA SUPERVIVENCIA DE LAS MOTONEURONAS DEL NÚCLEO
DEL VI PAR CRANEAL DE LA RATA TRAS LA ADMINISTRACION DE TOXINA
BOTULÍNICA Y DOXORRUBICINA EN EL MÚSCULO RECTO LATERAL", ha sido
realizada bajo mi dirección y tutela en el Laboratorio de Oftalmología Experimental del
Departamento de Oftalmología, Otorrinolaringología y Anatomía Patológica de la
Facultad de Medicina de la Universidad de Murcia, y reúne todos los requisitos para optar
al grado de Doctor.

Y para que así conste a los efectos oportunos, firmo la presente en Murcia, a ocho
de Mayo de mil novecientos noventa y seis.

Fdo: Dr. D. Manuel Vidal Sanz.

10 MAYO 1996



UNIVERSIDAD DE
MURCIA





UNIVERSIDAD DE MURCIA
DPTO. DE OFTALMOLOGIA, OTORRINOLARINGOLOGIA
Y ANATOMIA PATOLOGICA

LABORATORIO DE OFTALMOLOGIA EXPERIMENTAL
FACULTAD DE MEDICINA
30100 ESPINARDO - MURCIA - ESPAÑA
Teléf.: 34 68 36 39 61 - Fax: 34 68 36 39 62
E. Mail OFMMV01 @ FCU. UM. ES

D^a. MARÍA PAZ VILLEGAS PÉREZ, PROFESORA TITULAR DEL
DEPARTAMENTO DE OFTALMOLOGÍA DE LA UNIVERSIDAD DE MURCIA,

CERTIFICA:

Que la Tesis Doctoral presentada por D^a. Ana María Gómez Ramírez, titulada:
"ESTUDIO DE LA SUPERVIVENCIA DE LAS MOTONEURONAS DEL NÚCLEO
DEL VI PAR CRANEAL DE LA RATA TRAS LA ADMINISTRACION DE TOXINA
BOTULÍNICA Y DOXORRUBICINA EN EL MÚSCULO RECTO LATERAL", ha sido
realizada bajo mi dirección y tutela en el Laboratorio de Oftalmología Experimental del
Departamento de Oftalmología, Otorrinolaringología y Anatomía Patológica de la
Facultad de Medicina de la Universidad de Murcia, y reúne todos los requisitos para optar
al grado de Doctor.

Y para que así conste a los efectos oportunos, firmo la presente en Murcia, a ocho
de Mayo de mil novecientos noventa y seis.

Fdo: Prof. D^a. María Paz Villegas Pérez. **10 MAYO 1996**



UNIVERSIDAD DE
MURCIA





DEPARTAMENTO
DE
MEDICINA INTERNA
—
UNIVERSIDAD DE MURCIA

D. FERNANDO SÁNCHEZ GASCÓN, PROFESOR TITULAR DEL DEPARTAMENTO DE MEDICINA INTERNA DE LA UNIVERSIDAD DE MURCIA,

AUTORIZA, en calidad de Director del Departamento de Medicina Interna, y en calidad de Tutor de D^a. Ana María Gómez Ramírez, la presentación y defensa de la Tesis Doctoral titulada "ESTUDIO DE LA SUPERVIVENCIA DE LAS MOTONEURONAS DEL NÚCLEO DEL VI PAR CRANEAL DE LA RATA TRAS LA ADMINISTRACIÓN DE TOXINA BOTULÍNICA Y DOXORRUBICINA EN EL MÚSCULO RECTO LATERAL", realizada por D^a. Ana María Gómez Ramírez.

Y para que así conste a los efectos oportunos, firmo la presente en Murcia, a ocho de Mayo de mil novecientos noventa y seis.

Fdo: Prof. D. Fernando Sánchez Gascón

10 MAYO 1996



A Luis
A mis padres

RESUMEN

El objetivo de este trabajo consistía en desarrollar un modelo experimental que nos permitiera cuantificar los efectos de la administración intramuscular de dos sustancias neurotóxicas, la toxina botulínica tipo A (TxBA) y la doxorubicina (DXR), sobre las motoneuronas del núcleo del VI par craneal. Como las lesiones neuronales pueden inducir, entre otros, cambios importantes del fenotipo celular que dificultan la identificación de las neuronas, era preciso desarrollar previamente un método de marcaje de la totalidad de la población de motoneuronas con un marcador neuronal persistente.

En ratas hemos inyectado el marcador retrógrado fluorescente fluoro-gold (FG) en el músculo recto lateral (RL) del ojo, para: i) Determinar la eficacia de este trazador para marcar la población de motoneuronas que conforman el núcleo del VI par craneal; ii) investigar la utilidad del FG como marcador persistente en estudios a largo plazo; iii) estudiar el posible efecto neurotóxico del FG en esta población neuronal; iv) determinar si la administración de TxBA tiene algún efecto en la supervivencia de las motoneuronas del VI par craneal, y; v) cuantificar el efecto neurotóxico de la DXR sobre la supervivencia de dichas motoneuronas.

Nuestros resultados documentan que: i) La inyección de FG en el músculo RL produce, 7 días después, un marcaje homogéneo del soma y dendritas proximales de las motoneuronas del núcleo del VI par craneal. Mediante esta técnica hemos estimado que el número medio de motoneuronas que conforman este núcleo es de 271; ii) el FG comienza a desaparecer de los somas celulares 37 días después de su aplicación en el músculo RL, sin inducir efectos neurotóxicos aparentes en la población de motoneuronas estudiada; iii) el FG puede ser utilizado para cuantificar la muerte neuronal inducida por neurotoxinas; iv) la administración de TxBA no afecta la supervivencia neuronal ni a corto ni a largo plazo, y; v) la administración intramuscular de DXR induce en las motoneuronas del núcleo del VI par craneal muerte neuronal, que se observa a partir de la primera semana y es dosis dependiente.

Hemos puesto a punto un modelo experimental que nos permitirá en un futuro cuantificar los efectos de posibles agentes neurotóxicos sobre la supervivencia de la población de motoneuronas del núcleo del VI par craneal. Además, podremos también investigar los efectos de agentes neuroprotectores sobre los fenómenos de muerte neuronal.

INDICE

LISTA DE ABREVIATURAS	i
HALLAZGOS ORIGINALES	iii
PUBLICACIONES Y COMUNICACIONES	v
I. <u>INTRODUCCION</u>	1
Recuerdo Anatomico-funcional del núcleo del VI par craneal	2
1. Antecedentes históricos en el estudio de los núcleos oculomotores	2
2. Localización de motoneuronas en los núcleos oculomotores de la rata	4
2.1. Núcleo del III par craneal	5
2.2. Núcleo del IV par craneal	6
2.3. Núcleo del VI par craneal	7
2.4. Núcleo accesorio del VI par craneal	7
3. Organización del núcleo del VI par craneal	7
3.1. Tipos celulares que lo constituyen	7
3.2. Cuantificación, morfología y tamaño de las motoneuronas	10
4. Aferencias de los núcleos del sistema oculomotor	11
5. Estudios experimentales de supervivencia de motoneuronas del núcleo del VI par tras la administración de sustancias tóxicas en el músculo recto lateral	12
6. Características de los músculos extraoculares	12
Marcadores neuronales retrógrados: fluoro-gold	15
1. Antecedentes históricos del fluoro-gold	15
2. Características del marcaje retrógrado con fluoro-gold	16
3. Persistencia del fluoro-gold	18
4. Posibles efectos tóxicos del fluoro-gold	20
Toxina botulínica	22
1. Naturaleza y mecanismo de acción	22
2. Estudios funcionales y efectos axotomy-like	24
3. Uso de la toxina botulínica	28
3.1. En el tratamiento del estrabismo	29
3.1.1. Antecedentes históricos	29
3.1.2. Indicaciones. Ventajas e inconvenientes. Complicaciones	30
3.1.3. Mecanismo de acción	32
3.2. En el tratamiento del blefaroespasmó y el espasmó hemifacial	33

Doxorrubicina	36
1. Naturaleza y mecanismo de acción	36
2. Transporte suicida axoplásmico: Antecedentes históricos	38
3. Efectos neurotóxicos: Degeneración selectiva de neuronas	39
3.1. Cambios ultraestructurales	39
3.2. Explicación de los cambios ultraestructurales	40
3.3. Muerte neuronal	41
4. Efectos mitotóxicos: Pérdida de fibras musculares	43
4.1. Estudios en animales con doxorrubicina	43
4.2. Estudio clínico experimental con doxorrubicina	45
4.3. Ventajas e inconvenientes del uso clínico de la doxorrubicina	46
II. <u>OBJETIVOS</u>	48
III. <u>MATERIAL Y METODOS</u>	50
1. Animales de experimentación y anestesia	51
2. Marcaje retrógrado con fluorogold	52
3. Inyección de neurotoxinas	53
3.1. Toxina botulínica	53
3.2. Doxorrubicina	53
4. Grupos experimentales	54
4.1. Primer grupo experimental	54
4.2. Segundo grupo experimental	56
4.3. Tercer grupo experimental	57
5. Proceso tisular	59
5.1. Manejo del tronco del encéfalo	59
5.2. Examen y documentación de las secciones histológicas	61
5.3. Contaje de motoneuronas	62
6. Análisis estadístico	63
IV. <u>RESULTADOS</u>	64
1. Factor de Konigsmark	65
2. Primer grupo experimental: Eficacia del fluoro-gold como marcador retrógrado de la población de motoneuronas del núcleo del VI par craneal	66
2.1. Número de motoneuronas del núcleo del VI par craneal siete días tras la aplicación del fluoro-gold	66

2.2. Utilidad del fluoro-gold como marcador persistente de las motoneuronas del núcleo del VI par craneal	69
2.3. Posibles efectos sobre la supervivencia neuronal del marcaje con fluoro-gold	72
3. Segundo grupo experimental: Efectos a corto y largo plazo de la administración de distintas dosis de toxina botulínica tipo A, en el músculo recto lateral	74
4. Tercer grupo experimental: Cuantificación de los efectos neurotóxicos de la administración intramuscular de doxorubicina sobre la supervivencia de las motoneuronas del núcleo del VI par craneal	81
V. <u>DISCUSION</u>	92
1. Elección del núcleo del VI par craneal	93
2. Uso del fluoro-gold para marcar las motoneuronas del núcleo del VI par craneal	95
2.1. Eficacia del fluoro-gold para marcar las motoneuronas que inervan el músculo recto lateral	97
2.2. Persistencia del marcaje con fluoro-gold	98
2.3. Neurotoxicidad del fluoro-gold	99
3. Administración de toxina botulínica tipo A: Ausencia de muerte neuronal	100
3.1. Marcaje de motoneuronas	100
3.2. Efectos axotomy-like	102
3.3. Supervivencia neuronal. Transporte retrógrado	103
3.4. Efectos derivados de la administración de toxina botulínica	104
4. Administración de doxorubicina: Muerte neuronal	104
4.1. Marcaje retrógrado: Utilidad para estudiar efectos neurotóxicos	104
4.2. Degeneración selectiva de motoneuronas	105
4.3. Cuantificación de la muerte neuronal: Mecanismos de lesión	107
4.4. Perspectivas futuras y aplicabilidad clínica	109
4.4.1. En la investigación de enfermedad de motoneuronas experimental	109
4.4.2. Para valorar la eficacia de factores neuroprotectores	109
4.4.3. Para el tratamiento de desórdenes neuromusculares	110
VI. <u>CONCLUSIONES</u>	112
VII. <u>BIBLIOGRAFIA</u>	115



LISTA DE ABREVIATURAS

ACh: Acetil-Colina.

ADN: Acido desoxirribonucleico.

ARN: Acido ribonucleico.

°C: Grados centígrados.

cols.: Colaboradores.

DiI: Perclorato de 1,1'-dioctadecil-3,3',3'-tetrametil indocarbocianina.

DMSO: Dimetilsulfóxido.

DL50: Dosis letal media.

DS: Desviación estándar.

DXR: Doxorrubicina (Adriamicina).

EP: Elevador del párpado.

ESM: Error estándar de la media.

F: Factor de corrección de Konigsmark.

FG: Fluoro-gold.

FLM: Fascículo longitudinal medial.

HRP: Peroxidasa de rábano.

Fig.: Figura.

G: Gauges.

M: Molar.

n: Número de observaciones.

OI: Oblicuo inferior.

OS: Oblicuo superior.

p: Probabilidad.

PBS: Tampón fosfato salino.

RB: Retractor bulbi.

RE: Recto externo.

RI: Recto inferior.

RL: Recto lateral.

RM: Recto medial.

RS: Recto superior.

SITS: Acido 4-acetamido-4'-isotiocianoestilbeno-2,2'-disulfónico.

SNC: Sistema nervioso central.

TxBA: Toxina botulínica tipo A.

U: Unidades.

HALLAZGOS ORIGINALES

Las siguientes son observaciones originales recogidas en nuestro estudio de la supervivencia de las motoneuronas del núcleo del VI par craneal de la rata, tras la administración de las neurotoxinas, doxorubicina y toxina botulínica tipo A, utilizando técnicas de trazado neuronal retrógrado.

Contribuciones científicas:

1) Nuestras investigaciones, constituyen el primer estudio cuantitativo y detallado de la supervivencia de las motoneuronas del núcleo del VI par craneal de la rata, a los 30, 60 y 90 días de la administración de diversas dosis farmacológicas de toxina botulínica tipo A en el músculo recto lateral.

* Documenta que en los períodos de tiempo estudiados y a las dosis farmacológicas empleadas, la toxina botulínica tipo A no induce muerte neuronal en la población de motoneuronas del núcleo del VI par craneal.

* Sugiere que la utilización de la toxina botulínica tipo A en ratas jóvenes no altera el transporte axonal retrógrado ni induce daño aparente en el soma neuronal.

2) Nuestras investigaciones, constituyen también, el primer estudio cuantitativo y detallado de la muerte de las motoneuronas del núcleo del VI par craneal de la rata adulta, a los 7, 14 y 21 días de la administración de distintas dosis de doxorubicina en el músculo recto lateral de ratas adultas.

* Documenta que la doxorubicina es un potente neurotóxico, que administrado en el músculo recto lateral induce la muerte de gran parte de la población de motoneuronas aferentes, en un período de tiempo situado entre la primera y la segunda semana tras la inyección intramuscular.

* Sugiere que este efecto neurotóxico es dosis dependiente.

Contribuciones técnicas:

1) En esta Tesis, hemos caracterizado las propiedades del trazador neuronal fluorescente fluoro-gold como trazador neuronal persistente en el sistema oculomotor de la rata.

* Aporta que el fluoro-gold es un trazador neuronal útil para marcar la totalidad de las motoneuronas del núcleo del VI par craneal cuando se administra en el músculo recto lateral.

* Documenta que el fluoro-gold no es un trazador neuronal persistente, pues a los 37 días de su aplicación, su fluorescencia comienza a disminuir en intensidad y desaparecer de los somas neuronales.

* Documenta que el fluoro-gold no tiene efectos neurotóxicos a largo plazo sobre la población de motoneuronas del núcleo del VI par craneal.

2) Para los experimentos efectuados en esta Tesis, hemos desarrollado un nuevo modelo experimental, que permite el estudio del efecto de neurotoxinas sobre una población de motoneuronas.

PUBLICACIONES Y COMUNICACIONES

Parte del trabajo realizado en esta tesis, ha sido divulgado en las siguientes publicaciones científicas y comunicaciones a congresos:

Artículos:

Gómez Ramírez, A.M., Villegas-Pérez, M.P., Salvador Silva, M. y Vidal-Sanz, M. (1996). Utilidad del trazador neuronal fluoro-gold para marcar las motoneuronas del núcleo del VI par craneal. Arch. Soc. Esp. Oftalmol. (En prensa).

Gómez Ramírez, A.M., Villegas-Pérez, M.P., Miralles de Imperial, J. y Vidal-Sanz, M. (1996). Efecto de la toxina botulínica, a corto y largo plazo, sobre la población de motoneuronas del núcleo del VI par craneal, tras su inyección en el recto lateral de ratas jóvenes. Arch. Soc. Esp. Oftalmol. (En prensa).

Gómez Ramírez, A.M., Villegas-Pérez, M.P., Miralles de Imperial, J. y Vidal-Sanz, M. (1996). Efecto de la doxorubicina sobre la supervivencia de la población de motoneuronas del núcleo del VI par craneal, tras su inyección en el recto lateral. Arch. Soc. Esp. Oftalmol. (En prensa).

Abstracts:

Gómez Ramírez, A.M., Villegas-Pérez, M.P., Salvador Silva, M. y Vidal-Sanz, M. (1995). Use the fluorescent tracer fluoro-gold to identify the motoneuron population of the abducens nucleus: A quantitative in vivo study. Invest. Ophthalmol. Vis. Sci., 36 (4): S687.

Gómez Ramírez, A.M., Salvador Silva, M., Villegas-Pérez, M.P. y Vidal-Sanz, M. (1995). Efecto de diversas neurotoxinas en la población de motoneuronas del VI par craneal. Rev. Neurol. (Barc.), 23 (121): 616.

Gómez Ramírez, A.M., Villegas-Pérez, M.P., Salvador Silva, M. y Vidal-Sanz, M. (1995).
Anatomical study of the VI nucleus of the adult rat. Documenta Ophthalmológica.

Comunicaciones a Congresos:

Estudio morfométrico del núcleo del motor ocular externo con el trazador neuronal fluoro-gold. LXX Congreso de la Sociedad Española de Oftalmología. Tenerife, Octubre de 1994.

Anatomical study of the VI nucleus of the adult rat. Joint European Research Meeting in Ophthalmology and Vision (JERMOV). Montpellier, Octubre de 1994.

Use of the fluorescent tracer fluoro-gold to identify the motoneuron population of the abducens nucleus: A quantitative in vivo study. Annual meeting of the Association for Research in Vision and Ophthalmology (ARVO), Florida, Mayo de 1995.

Efecto de diversas neurotoxinas en la población de motoneuronas del núcleo del VI par craneal. Congreso de Neurociencias, Valladolid, Julio de 1995.

Efecto de la toxina botulínica a corto y a largo plazo, sobre la población de motoneuronas del núcleo del VI par craneal, tras su inyección en el recto lateral de ratas jóvenes. LXXI Congreso de la Sociedad Española de Oftalmología, Salamanca, Septiembre de 1995.

Efecto de la doxorubicina sobre la supervivencia de la población de motoneuronas del núcleo del VI par craneal, tras su inyección en el recto lateral. LXXI Congreso de la Sociedad Española de Oftalmología, Salamanca, Septiembre de 1995.

I. INTRODUCCION



RECUERDO ANATOMO-FUNCIONAL DEL NUCLEO DEL VI PAR CRANEAL

1. Antecedentes históricos en el estudio de los núcleos oculomotores

Las neuronas de los núcleos oculomotores se localizan en el tronco del encéfalo e inervan a los músculos extrínsecos del ojo, que son los responsables de la motilidad del globo ocular. Los movimientos oculares tienen como misión conducir los estímulos visuales del campo periférico de visión (retina periférica) al campo visual central (fóvea) y mantener la fijación foveal del objeto en movimiento. Esta captación y afianzamiento de las imágenes por la fóvea y su estabilización en ella durante los movimientos de la cabeza constituyen las funciones básicas de la motilidad ocular (Dell'Osso y Daroff, 1993).

Los núcleos oculomotores están inmersos en un complejo sistema de conexiones nerviosas en el tronco del encéfalo. Debido a que en esta estructura coexisten con otros núcleos neuronales, células no neuronales e importantes fascículos nerviosos, y a que los límites de algunos grupos neuronales no están bien definidos, ha sido difícil su identificación.

Para estudiar la localización y la organización de las motoneuronas que inervan los músculos extraoculares se han empleado métodos clínicos, neuroanatómicos y electrofisiológicos (Hensen y Völckers, 1878; Edinger, 1885; Bernheimer, 1897; Bach, 1899; Von Monakov, 1905; Brouwer, 1918), pero siempre con relativa falta de éxito hasta Warwick (1951, 1953) que investigó los núcleos oculomotores del mono usando técnicas de degeneración neuronal retrógrada. En su estudio de 1953, Warwick hace una completa revisión de los trabajos de autores anteriores, poniendo de manifiesto que las técnicas que empleaban eran inadecuadas. Tarlov y Tarlov (1971) documentaron, usando también técnicas de degeneración

retrógrada, que los núcleos oculomotores del gato tenían una organización diferente a la del mono, confirmando la existencia de diferencias entre diversas especies, hecho que había contribuido a la controversia en investigaciones previas.

Más recientemente, el transporte retrógrado de peroxidasa de rábano (HRP) fué usado por Gacek (1974) para estudiar las motoneuronas de los núcleos oculomotores del gato recién nacido y por Akagi (1978), para estudiar las del gato adulto y las del conejo. En 1980, Glicksman usó el transporte retrógrado con HRP y aglutinina de germen de trigo marcada con yodo radiactivo (I^{125}) para localizar las motoneuronas que inervan los músculos extraoculares de la rata, describiendo una distribución en la rata que recordaba a la del conejo. Labandeira-García (1980) encontró una semejanza mucho menos pronunciada de la que encuentra Glicksman (1980), entre la rata y el conejo, utilizando también HRP. En 1983, Labandeira-García y cols. repitieron sus investigaciones en ratas, utilizando además de la peroxidasa, trazadores retrógrados fluorescentes (bisbenzimidazoles, ioduro de propidio y DAPI-primulina) inyectados en uno o más músculos (Kuypers y cols., 1977; Kuypers y cols., 1979; Bentivoglio y cols., 1979; Bentivoglio y cols., 1980a,b; Olmos y Heimer, 1980), confirmando sus primeros resultados. Cabrera y cols. (1988) han estudiado también la organización de las motoneuronas e interneuronas del núcleo del VI par craneal de la rata utilizando técnicas de transporte retrógrado como la HRP (Kristensson y Olsson, 1971; Kristensson y cols., 1971), el azul verdadero (Kuypers y cols., 1980) y el fluoro-gold (FG, Schmued y Fallon, 1986), obteniendo una idea más clara de la posición relativa de las dos distintas poblaciones del mismo núcleo.

2. Localización de motoneuronas en los núcleos oculomotores de la rata

Aunque la localización precisa de las motoneuronas de los núcleos oculomotores en el tronco del encéfalo difiere según las especies, existen algunas similitudes manifiestas que serían el resultado de una común secuencia ontogenética en el desarrollo de estas motoneuronas y los músculos extraoculares. Así, las motoneuronas del músculo recto inferior (RI) ocupan la porción rostral del núcleo del motor ocular común, situándose las motoneuronas del músculo recto superior (RS) en la zona caudal de dicho núcleo. Las motoneuronas de los músculos recto medial (RM) y oblicuo inferior (OI) se solapan en su distribución, extendiéndose entre las poblaciones de los músculos RI y del RS. Esta organización general parece ser una consecuencia de patrones similares de diferenciación durante el desarrollo (Evinger, 1988), que siguen una secuencia caudo-rostral en la diferenciación tanto de los músculos como de las motoneuronas de los núcleos oculomotores. El músculo recto lateral o recto externo (RL o RE) y, en las especies que existe, el músculo retractor bulbi (RB) se diferencian primero, seguidos por el desarrollo del músculo oblicuo superior (OS), después se origina el RS, seguido por el OI, RM y RI respectivamente, por último en el estadio final el músculo elevador del párpado (EP) se separa del músculo RS (Leser, 1925; Adelman, 1927; Gilbert, 1947). Como los músculos, las motoneuronas extraoculares que los inervan siguen un desarrollo caudo-craneal, diferenciándose primero las del núcleo del VI par craneal o motor ocular externo, seguidas por las del núcleo del IV par craneal o núcleo troclear y en último lugar las motoneuronas del núcleo del III par craneal o motor ocular común (Shaw y Alley, 1981), (Fig. 1).

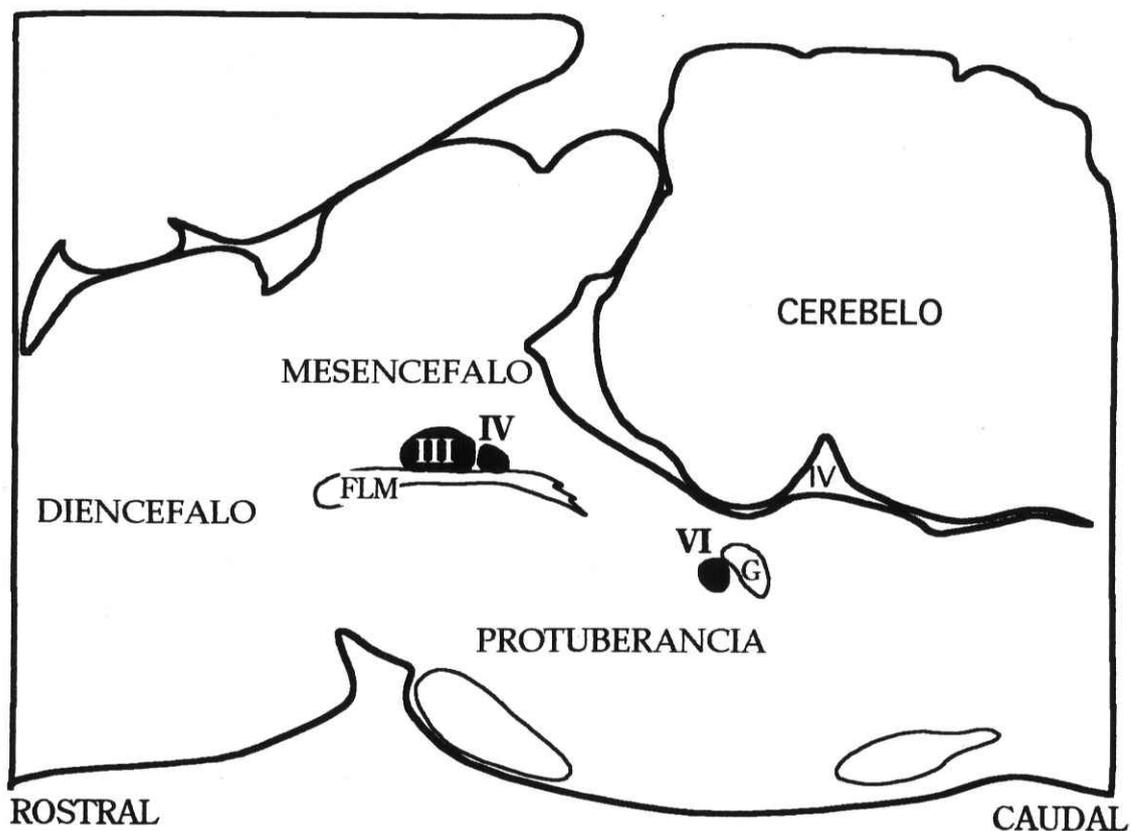


Fig. 1. Esquema que representa la localización de los núcleos oculomotores en el troncoencefalo de la rata, en el plano sagital. (III, núcleo del III par craneal; IV, núcleo del IV par craneal; VI, núcleo del VI par craneal; G, rodilla del facial; FLM, fascículo longitudinal medial y IV, cuarto ventrículo).

2.1. Núcleo del III par craneal o motor ocular común

La localización de motoneuronas en el núcleo del motor ocular común de la rata ha sido determinada por Glicksman (1980), Oda (1981) y Labandeira-García y cols. (1983). Estas motoneuronas se sitúan en el mesencéfalo (Fig. 1) e inervan los músculos RI, RM y OI ipsilaterales y los músculos RS y EP contralaterales. La distribución rostro-caudal de estas poblaciones de motoneuronas en todas las especies, sigue la secuencia RI, RM, OI, RS, EP. En la rata el subgrupo de motoneuronas que inervan el músculo RI, se extiende ventro-medialmente en los dos

tercios rostrales del núcleo. Las motoneuronas que inervan al músculo OI ocupan una región caudal y dorsal a la mayoría de las motoneuronas del músculo RM. Las motoneuronas de los músculos RS y EP asumen una localización caudal y lateral en el núcleo (Glicksman, 1980; Oda, 1981; Gómez-Segade y Labandeira-García, 1983; Labandeira-García y cols., 1983; Evinger y cols., 1987). Las motoneuronas que se localizan en el fascículo longitudinal medial (FLM) inervan principalmente al músculo RM ipsilateral (Evinger, 1988).

Cuando se compara la organización general del núcleo del motor ocular común en diferentes mamíferos, se observa en la rata (Labandeira-García y cols., 1983) la ausencia de una clara división del núcleo en distintos subgrupos de neuronas, que sí es observada en el mono, gato y conejo (Warwick, 1953; Tarlov y Tarlov, 1971; Gacek, 1974; Akagi, 1978). Saban (1968) ha postulado que la razón de la incompleta organización del núcleo del III par craneal de la rata en comparación con los mamíferos antes mencionados, quizás se encuentre en la inferior motilidad y desarrollo de su musculatura extraocular, limitados por la gran córnea de la rata que ocupa casi la mitad del globo ocular.

2.2. Núcleo del IV par craneal o núcleo troclear

El núcleo troclear ocupa una región inmediatamente caudal y ligeramente lateral al núcleo del motor ocular común (Fig. 1). En la rata (Labandeira-García y cols., 1983) la porción rostral de este núcleo se mezcla con las motoneuronas caudales del núcleo del III par craneal. En todos los vertebrados estudiados hasta ahora, aproximadamente el 96-98% de las motoneuronas del núcleo troclear inervan al músculo OS contralateral, proyectando el resto de motoneuronas al músculo OS ipsilateral (Shaw y cols., 1983; Murphy y cols. 1984, 1986; Evinger y cols., 1987).

2.3. Núcleo del VI par craneal o motor ocular externo

El núcleo del VI par craneal se sitúa en la protuberancia dorsal (Fig. 1), cerca de la línea media y del suelo del IV ventrículo, entre la rodilla del nervio facial y el fascículo longitudinal medial (FLM). Los axones de las motoneuronas de este núcleo, que constituyen el nervio motor ocular externo, se dirigen en dirección ventral, lateral y caudal, para atravesar la parte caudal de la protuberancia y emerger por el surco bulboprotuberancial, a continuación y tras un largo trayecto intracraneal, llegan a la órbita, penetrando en la cara medial del músculo RL.

2.4. Núcleo accesorio del VI par craneal

Las motoneuronas del núcleo accesorio inervan el músculo retractor bulbi ipsilateral de la rata (Labandeira-García y Gómez-Segade, 1983). La contracción de este músculo retrae el globo ocular hacia adentro de la órbita (Labandeira-García y cols., 1987). Labandeira-García y Gómez-Segade (1983) documentaron que este núcleo, en la rata, está constituido por 30-40 motoneuronas que se sitúan en la protuberancia ventral, justo sobre la oliva superior y cerca del núcleo espinal del nervio trigémino, y cuyos axones se dirigen dorsalmente y medialmente hacia el núcleo del VI par craneal ipsilateral, para unirse a los axones de las motoneuronas de este último núcleo en el VI par.

3. Organización del núcleo del VI par craneal o motor ocular externo

3.1. Tipos celulares que lo constituyen

Recientes investigaciones (Steiger y Büttner-Ennever, 1978,1979; Glicksman, 1980; Delgado-García y cols., 1986a, Langer y cols., 1986) han documentado que el

núcleo del VI par craneal de varias especies de mamíferos contiene dos tipos neuronales bien caracterizados: las motoneuronas que inervan el músculo RL ipsilateral y las neuronas internucleares o interneuronas, cuyos axones proyectan, tras cruzar la línea media y vía el FLM contralateral, al núcleo del III par craneal contralateral, específicamente al área donde se localizan las motoneuronas del músculo RM (Highstein y Baker, 1978; Glicksman, 1980; Büttner-Ennever y Akert, 1981), jugando un papel esencial en la coordinación de los músculos RL y RM durante los movimientos horizontales conjugados del ojo (Highstein y Baker, 1978; McCrea y cols., 1986; de la Cruz y cols., 1989). El papel principal de las interneuronas en animales con visión frontal se cree que es coordinar los músculos RL y RM de cada ojo para la visión binocular (Delgado-García y cols., 1986a,b), pero otro posible papel de las vías internucleares sería proveer a las motoneuronas de las señales necesarias durante los reflejos vestibulo-ocular y optocinético (Fite y cols., 1979; Dieringer y cols., 1983).

La localización exacta de estas interneuronas es específica de cada especie: En el mono, el gato y el conejo se distribuyen entre las motoneuronas del VI par craneal. En la rata están espacialmente separadas de las motoneuronas, situándose en la parte ventrolateral del núcleo, mientras que la distribución de las motoneuronas en dicho núcleo, se limita al área dorsal próxima al IV ventrículo y a un área más ventral cerca de la línea media (Glicksman, 1980; Cabrera y cols., 1988) (Fig. 2). El hecho de que motoneuronas e interneuronas estén entremezcladas en mamíferos con alto desarrollo de la visión binocular frontal y de la mirada conjugada, y claramente separadas en otros con los ojos situados lateralmente y poca visión binocular como la rata (Labandeira-García y cols., 1989), sugiere que los animales con visión frontal requieren una mayor proximidad entre los dos tipos de neuronas para facilitar la organización de aferencias comunes (Baker y cols., 1980; Delgado-García y cols., 1986b; McCrea y cols., 1986; Cabrera y cols., 1988).

En todas las especies investigadas, la mayoría de las motoneuronas inervan el músculo RL ipsilateral. Aunque la mayor parte de las interneuronas proyectan vía el FLM contralateral a las motoneuronas del músculo RM contralateral, en ratas, monos y gatos se ha documentado que un pequeño grupo de interneuronas proyectan bilateralmente al flóculo del cerebelo (Blanks y cols., 1983; Graybiel, 1977, Langer y cols., 1985).

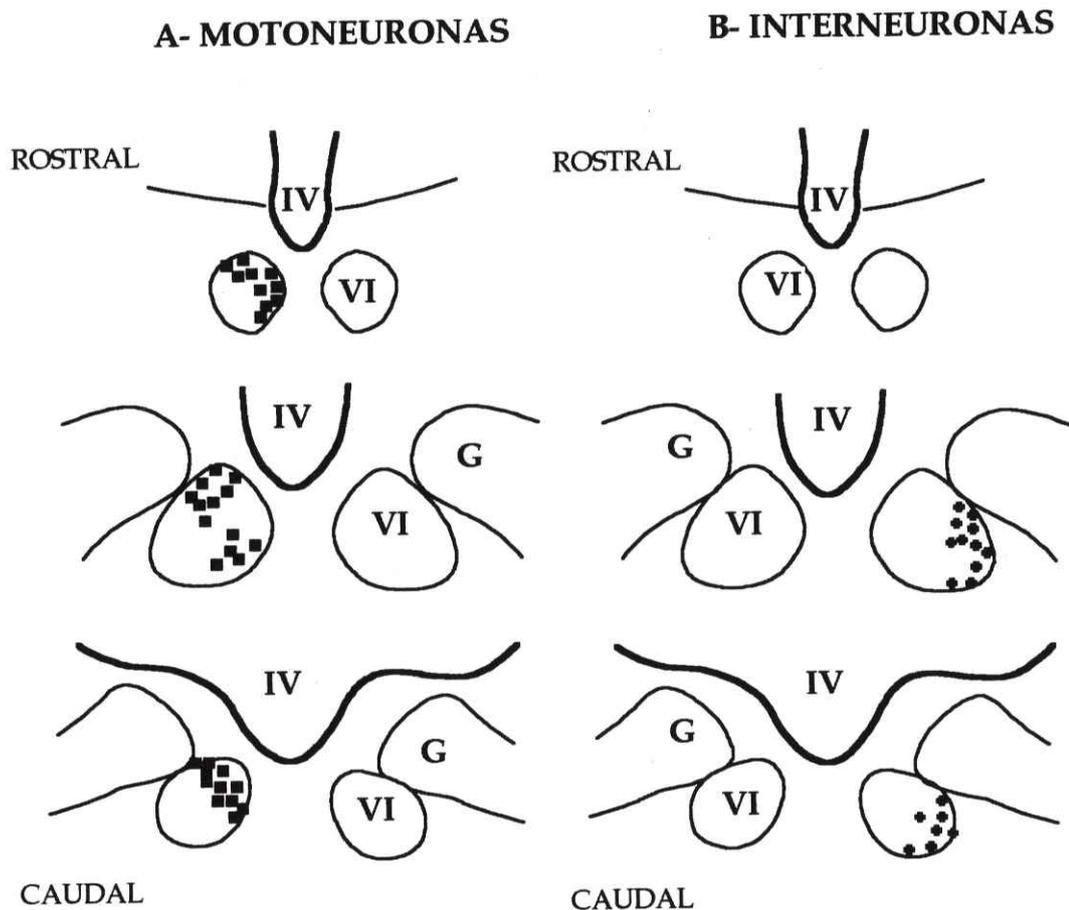


Fig. 2. Esquema que representa la localización de las motoneuronas e interneuronas en el núcleo del VI par de la rata (según Glicksman, 1980). VI, núcleo del VI par craneal; G, rodilla del facial; IV, cuarto ventrículo.

3.2. Cuantificación, morfología y tamaño de las motoneuronas

Labandeira-García y cols. (1983) han contabilizado el número de neuronas, teñidas con violeta de cresilo, que aparecen en las secciones del troncoencéfalo y que corresponden por su localización al núcleo del VI par craneal de ratas adultas, documentando que este núcleo contiene 400 ± 20 (Media \pm DS) neuronas. Sin embargo, el número de neuronas marcadas cuando estos autores inyectan un trazador neuronal (HRP, DAPI-primulina o bisbenzimidida) en el músculo RL, es de 275 ± 20 , por lo que deducen que un 25-35% de neuronas de este núcleo no se marcan y son, presumiblemente, interneuronas. Estos autores además, distinguieron por su localización y tamaño tres grupos de motoneuronas: i) un grupo dorsal situado en los dos tercios rostrales del núcleo; ii) un grupo más ventral en los dos tercios caudales y iii) un grupo que comprende del 4-10% de las motoneuronas marcadas, localizadas entre las fibras del FLM a nivel de los dos tercios rostrales del núcleo. Estas últimas motoneuronas tenían un tamaño notablemente inferior a las de los otros dos grupos (Labandeira-García y cols., 1983).

Cabrera y cols. (1988) utilizando como trazadores neuronales la HRP y los fluorocromos azul verdadero y FG encontraron también que las interneuronas del núcleo del VI par en la rata sólo constituyen un 30% de la población neuronal de dicho núcleo y contabilizaron 106 ± 81 (Media \pm DS) interneuronas (rango de 24-252) frente a 243 ± 73 (rango de 152-332) motoneuronas. Estos autores también estimaron que el tamaño de las motoneuronas era ligeramente superior al de las interneuronas, aunque ambas poblaciones contenían tanto neuronas fusiformes pequeñas como neuronas piramidales, con múltiples dendritas. Así mismo observaron que las neuronas más grandes eran multipolares y predominantemente motoneuronas, mientras que las más pequeñas eran fusiformes y predominantemente neuronas internucleares. Cabrera y cols. (1988) observaron además que el diámetro medio del

soma de las motoneuronas de la rata era de 26 ± 6 micras (Media \pm DS, rango de 15-35), mientras que el de las interneuronas era de 18 ± 5 micras (rango de 10-25). En un estudio previo Labandeira-García y cols. (1983) habían indicado que el diámetro medio de estas motoneuronas es de 21,4 micras.

4. Aferencias a los núcleos del sistema oculomotor

Las motoneuronas de los núcleos motores extraoculares constituyen el lugar final de convergencia de señales premotoras relacionadas con el control de los movimientos del ojo. Las aferencias premotoras hacia el núcleo del VI par, núcleo troclear y núcleo del motor ocular común incluyen conexiones sinápticas tanto excitatorias como inhibitorias, que se originan principalmente en las neuronas vestibulares (Highstein, 1973; Büttner-Ennever, 1981; Uchino y Hirai, 1984; Escudero y Delgado-García, 1988), reticulares (Nakao y Shiraishi, 1983, 1985; Weiss y Disterhoft, 1985; Langer y cols., 1986; Escudero y Delgado-García, 1988), del núcleo prehipogloso (Gacek, 1977; Graybiel, 1977; McCrea y cols., 1979; McCrea y Baker, 1985), del núcleo intersticial de Cajal (Büttner-Ennever, 1977; Graybiel, 1977; Nakao y Shiraishi, 1983, 1985) y del colículo superior (A. Grantyn y cols., 1980, 1987; R. Grantyn y cols., 1980). Esta diversidad de conexiones aferentes premotoras sugieren que el sistema oculomotor no puede ser considerado como simples columnas de neuronas, sino que debe ser reconocido como una compleja red de vías interaccionando a muchos niveles (Evinger, 1988).

5. Estudios experimentales de supervivencia de motoneuronas del núcleo del VI par craneal tras la administración de sustancias tóxicas en el músculo recto lateral

De la Cruz y cols. (1991) estudiaron desde el punto de vista histológico y electrofisiológico el comportamiento de las motoneuronas del núcleo del VI par craneal del gato adulto, tras la inyección en el músculo RL de ricina, una lectina extremadamente citotóxica. Estos autores observaron cuando examinaron al microscopio las secciones histológicas, teñidas con violeta de cresilo, del troncoencéfalo, una sustancial disminución del número de motoneuronas del núcleo del VI par craneal ipsilateral al músculo RL inyectado, y que 10 días tras la administración del tóxico había una supervivencia de solamente el 10-15% de motoneuronas respecto al núcleo control contralateral. Estos autores han postulado que este pequeño porcentaje de neuronas supervivientes podrían ser las que proyectan exclusivamente al músculo retractor bulbi, y que podrían corresponder al 10% de motoneuronas descritas en el núcleo del VI par craneal del gato que producen una señal de retracción ocular (Delgado-García y cols., 1990).

6. Características de los músculos extraoculares

El control motor de los movimientos oculares precisa la capacidad de mover los ojos rápida o lentamente y de poder también mantenerlos en una posición relativamente estacionaria. Los músculos extraoculares son los responsables de la motilidad del globo ocular y aunque pertenecen a la musculatura estriada, presentan características especiales, ya que están constituidos por dos tipos de fibras musculares: lentas y rápidas.

Hess, en 1961, utilizando el microscopio electrónico, demostró por vez primera la existencia de dos tipos morfológicos de fibras en los músculos oculomotores, las fibras musculares con inervación múltiple y las focalmente inervadas. En 1963, Hess y Pilar observaron una correlación entre estos hallazgos anatómicos y dos tipos fisiológicos de actividad contráctil de la musculatura extraocular: lenta o tónica y rápida o de contracción. Miller (1967) por métodos histoquímicos, demostró que la capa orbitaria o superficial de la musculatura extraocular contenía dos tipos de fibras pequeñas o cortas, y que esta capa superficial se correspondía con el músculo rojo clásico, con alto contenido en mitocondrias, las cuales por tener enzimas oxidativas, capacitan a la fibra para un trabajo más prolongado. La porción central del músculo extraocular o capa del globo estaba constituida por fibras largas y correspondía al músculo blanco, pobre en mitocondrias y rico en enzimas glicolíticas, disponiéndose de esta manera para un trabajo más rápido y breve.

Peachey, en 1971, subdividió las fibras musculares extraoculares en cinco grupos, así, la capa orbitaria estaría constituida por dos tipos de fibras de pequeño diámetro, una de ellas con inervación múltiple y la otra con inervación focal. La capa del globo estaría a su vez constituida por tres tipos de fibras, todas de mayor tamaño que las fibras de la capa orbitaria, dos de ellas con inervación individual y una de ellas con inervación múltiple.

Las fibras rápidas de la musculatura extraocular son similares a las fibras rápidas del músculo esquelético. Una fibra rápida es inervada por una gran motoneurona, que puede tener varias placas terminales, y la fibra conduce potenciales de acción propagados. La unión neuromuscular está formada por una placa motora terminal típica. Por el contrario, las fibras lentas no se encuentran en la musculatura esquelética de los mamíferos, pero sí aparecen en los músculos del oído medio. Están inervadas por motoneuronas de pequeño diámetro cuyas terminaciones

se encuentran en la proximidad del sarcolema, pero sin el desarrollo de un refinado aparato postsináptico (Adler, 1994).

MARCADORES NEURONALES RETRÓGRADOS: FLUORO-GOLD

1. Antecedentes históricos del fluoro-gold

Desde la introducción de la técnica de marcaje axonal retrógrado con peroxidasa de rábano (HRP) por Kristensson y Olsson (1971), se han desarrollado otros marcadores neuronales alternativos que han permitido estudiar las conexiones neuronales. Muchos de estos nuevos trazadores son sustancias orgánicas fluorescentes y han sido identificados por varios autores, entre ellos por Van der Kooy y cols. (1978), Kuypers y cols. (1979,1980), Bentivoglio y cols. (1980a,b) y Keizer y cols. (1983).

A pesar de la superior sensibilidad de estos nuevos marcadores fluorescentes, éstos presentan limitaciones tales como la rápida desaparición de su fluorescencia, la captación por fibras nerviosas contiguas a las marcadas, limitada definición celular y difusión del trazador desde las neuronas marcadas al espacio extracelular y a otras células (Schmued y Fallon, 1986). Algunos de estos inconvenientes parecían solventados, cuando Schmued y Swanson (1982) documentaron que el fluorocromo ácido 4-acetamido-4'-isotiocianoestilbeno-2,2'-disulfónico (SITS) podría ser usado como trazador neuronal retrógrado sin ser captado por las fibras de paso, persistiendo su marcaje en el tiempo y no difundiendo desde las células durante largos intervalos de tiempo, siendo su uso también compatible con la realización de otras técnicas neurohistoquímicas. Sin embargo, este marcador presentaba un importante inconveniente por la variabilidad y heterogeneidad de los preparados comerciales (Payne y cols., 1983; Schmued y Fallon, 1986).

Posteriormente se descubrió que otros derivados estilbenos, el stilbene-gold (Schmued y Fallon, 1985) y el fluoro-gold (FG), podían ser transportados retrógradamente por los axones. El FG mostraba mayor intensidad de emisión

(fluorescencia) que el stilbene-gold, así mismo exhibía muchas ventajas no vistas en la mayoría de los trazadores retrógrados existentes, siendo su preparado comercial puro y consistente (Schmued y Fallon, 1986).

2. Características del marcaje retrógrado con fluoro-gold

El marcaje retrógrado con FG, derivado estilbena utilizado por primera vez por Schmued y Fallon en 1986, se caracteriza por la presencia de gránulos color oro, a pH neutro y básico, intensamente fluorescentes dentro del citoplasma neuronal y las prolongaciones del mismo. Aunque secundariamente las membranas plasmáticas y el nucléolo también secuestran algo de marcador, el núcleo no se tiñe. Así mismo, no se ha documentado que difunda desde las neuronas marcadas a otras adyacentes, ni tampoco a células gliales, en los tiempos de supervivencia usados.

Schmued y Fallon (1986) documentaron que la inyección de altas concentraciones de FG (5%-10%) disuelto en suero salino fisiológico o agua destilada, o de grandes volúmenes del mismo (0,2-0,5 microlitros), en varias zonas del sistema nervioso central, tales como el núcleo estriado, córtex sensorio-motor y el núcleo supraquiasmático, se traducían en un masivo e intenso marcaje retrógrado de la sustancia negra, núcleo ventral del tálamo y núcleo geniculado ventro-lateral respectivamente, pero también podría producir necrosis en el lugar de inyección. Concentraciones del 2-3% permitirían un buen marcaje con inapreciable lesión en el lugar de inyección, donde aparece típicamente una pequeña zona de necrosis adyacente al trayecto de la aguja, rodeada de un área bien circunscrita en la que todos los componentes tisulares exhiben una fluorescencia brillante.

Aunque el FG no parece salir de las células marcadas a pesar de largos períodos de supervivencia, variando estos tiempos se pueden obtener interesantes diferencias en cuanto a la gradación del relleno de axones y dendritas. Así, tiempos

de supervivencia cortos, de 1-2 días, muestran típicamente vesículas en el citoplasma y el axón, y períodos de supervivencia más largos, de 4 días a 4 semanas, muestran acúmulo de gránulos en el soma y extenso relleno de dendritas, desapareciendo de los axones. Los procesos dendríticos presentan a menudo una extensión de cientos de micras.

Este trazador no es captado por fibras indemnes de paso y por consiguiente, éstas no lo transportan retrógradamente, mientras que axones cortados o dañados sí lo captan y lo transportan. Así, Schmued y Fallon (1986) han descrito un buen marcaje de motoneuronas a nivel del asta ventral de la médula espinal lumbar, en ratas albinas, tras empapar el nervio ciático cortado con una solución de FG durante 2 horas y tras un período de supervivencia de los animales de 4 días. Sin embargo, no observaron marcaje de estas neuronas si dejaban el nervio ciático intacto, a pesar de ponerlo en contacto con dicha solución durante 2 horas. Según estos autores, los tractos de fibras mielínicas (tales como la comisura anterior o fascículos del caudado-putamen) próximos al lugar de la inyección del FG en el sistema nervioso central (SNC) no parecen tampoco secuestrar al trazador.

La captación del FG por los terminales axonales parece que se produce por un proceso de endocitosis vesicular, ya que ciertas propiedades físicas del trazador, como la carga, el cociente hidrosolubilidad/liposolubilidad, la polaridad, el tamaño etc., impedirían su difusión pasiva a través de la membrana plasmática (Schmued y Fallon, 1986, Snyder-Keller, 1988). Estas vesículas pinocíticas de intensa fluorescencia dorada son retrógradamente transportadas por el axón al cuerpo celular, donde se acumulan y sufren una pequeña degradación, pudiendo ser transportadas activamente a lo largo de las dendritas, produciendo un extenso relleno de las mismas.

Schmued y Fallon (1986) documentaron que el FG, al igual que la HRP y otros trazadores fluorescentes, puede tener un transporte bidireccional, ya que

observaron que su inyección en el núcleo estriado de la rata albina producía el marcaje de la parte reticular de la sustancia negra (transporte retrógrado), mientras que su inyección en el córtex motor producía el marcaje axonal del tracto piramidal y del córtex contralateral (transporte anterógrado), lo que indicaría su transporte bidireccional. Merchenthaler (1991) observó que no se producía transporte trans-sináptico del FG.

El FG no atraviesa la barrera hematoencefálica, y cuando es inyectado directamente en el ventrículo lateral a altas concentraciones, puede producir un halo de débil fluorescencia en áreas circunventriculares. Este marcaje difuso, corresponde principalmente a un marcaje astrocítico y endotelial, y es fácilmente distinguible del marcaje retrógrado neuronal. Así mismo, no hay evidencia de posterior transporte retrógrado del trazador desde estas regiones marcadas alrededor del ventrículo a otras áreas (Schmued y Fallon, 1986).

Merchenthaler (1991) documentó que tras la administración intraperitoneal e intravenosa de FG en ratas y ratones se marcaban todas aquellas neuronas del SNC, cuyos axones no están protegidos por la barrera hematoencefálica, estando sus terminales axonales en contacto con capilares fenestrados. Así, observó, que todos los ganglios raquídeos dorsales, los ganglios sensoriales de ciertos nervios craneales, y todas las motoneuronas del cerebro y de la médula espinal se marcaban con FG, ya que el marcador aunque no puede cruzar la barrera hematoencefálica, difunde libremente a través de los tejidos periféricos y es captado por los terminales axonales de los órganos sensoriales y las placas motoras terminales.

3. Persistencia del fluoro-gold

Schmued y Fallon (1986) observaron que tras inyectar FG en varios lugares del cerebro de ratas albinas, no se producía pérdida detectable del marcaje neuronal

obtenido, siendo el mayor tiempo de supervivencia estudiado de los animales tras la administración del trazador de 60 días. Este dato fué corroborado posteriormente por Snyder-Keller (1988), quien documentó la visualización en ratas adultas de neuronas del estriado marcadas con FG en el período postnatal (P2-P28). La supervivencia máxima de éstos animales fué de 50 días tras la inyección. Del Cerro y cols. (1990), tras la inyección intravítrea de FG en ratas y ratones, tampoco observaron en el tiempo que duró su estudio (37 días), pérdida de marcaje en las células ganglionares, los fotorreceptores, o en las neuronas de la capa nuclear interna de la retina. Divac y Mogensen (1990) sugirieron que la apariencia y el número de neuronas marcadas parece no afectarse por el tiempo de supervivencia, después de un año de la administración de FG en el hemisferio izquierdo de ratas Wistar. Tras tres meses de la inyección de FG intraperitoneal e intravenosa, no se detectaron tampoco cambios en la fluorescencia de las neuronas marcadas (Merchenthaler, 1991).

Este trazador permitiría por lo tanto, realizar estudios con amplio margen de tiempo de supervivencia, ya que no desaparece de las células marcadas (Schmued y Fallon, 1986; Snyder-Keller, 1988; del Cerro y cols., 1990; Divac y Mogensen, 1990; Merchenthaler, 1991), siendo a la vez compatible con otras técnicas como la autorradiografía, histoquímica enzimática, inmunohistoquímica, fijación con plástico o parafina y otros marcadores retrógrados fluorescentes como los descritos por Van der Kooy y cols. (1978) y Kuypers y cols. (1980). También se ha revelado como un trazador neuronal útil para estudios con microscopía electrónica, ya que en las neuronas marcadas aparecen cambios morfológicos que pueden ser observados con esta técnica (Schmued y cols., 1989).

El FG también presenta ventajas a la hora de fotografiar las neuronas marcadas, ya que requiere menor tiempo de exposición que otros marcadores. Sin embargo, prolongadas exposiciones del tejido marcado a la luz ultravioleta causa una pequeña disminución de la intensidad de la fluorescencia (Schmued y Fallon, 1986).

4. Posibles efectos tóxicos del fluoro-gold

En estudios realizados con microscopía electrónica, Schmued y cols. (1989) documentaron, tras la administración de FG en el estriado y en la médula espinal torácica de ratas albinas, que las neuronas retrógradamente marcadas en las regiones cerebrales que proyectan a las áreas inyectadas, contenían en su citoplasma y dendritas, numerosas organelas electronodensas parecidas a los lisosomas, que no se encuentran habitualmente en las neuronas normales. También observaron que no alteraban el patrón normal de organelas en las células marcadas, ya que el aparato de Golgi y los cuerpos de Nissl aparecían normales. Estas estructuras parecidas a los lisosomas, incluían cuerpos lamelares, lisosomas heterogéneos o lipofuscin-like y lisosomas de grueso granulado, sin embargo, la cantidad y variedad de estas estructuras era distinta según la región cerebral a la que pertenecieran las neuronas que contenían el marcador, por lo que concluyeron, que el FG no produce cambios ultraestructurales uniformes en todos los tipos celulares que lo incorporan, relacionando este hecho con el diferente metabolismo de cada tipo de neurona. Del Cerro y cols. (1990) observaron también todas esas estructuras parecidas a los lisosomas en las células ganglionares y en las neuronas de la capa nuclear interna de la retina tras la inyección intravítrea de FG, pero en los fotorreceptores sólo aparecían cuerpos lamelares, lo que ratifica que la aparición de estas organelas podría estar limitada por las características fisiológicas inherentes a cada tipo celular expuesto al FG. No se sabe todavía, si algún tipo de estos lisosomas observados sería debido directamente al FG o más bien sería una reacción fisiológica sobre membranas por el trazador, pero este fenómeno no se puede explicar por el simple daño por la inyección, ya que la inyección de HRP (Broadwell y Brightman, 1979) no induce la aparición de estos lisosomas. Varias interpretaciones podrían explicar estos cambios, sin embargo, no se puede excluir la posibilidad de que el FG pueda

inducir un tipo de daño más específico (del Cerro y cols., 1990). Se ha documentado que muchas condiciones patológicas o experimentales, tales como la enfermedad de Tay-Sachs o la inyección de cloroquina en el ventrículo lateral, entre otras, pueden inducir la formación de similares reacciones lisosomales (del Cerro y Snider, 1967; Schmued y cols., 1989), además, células nerviosas normales (células ganglionares de las retinas controles) que no habían sido expuestas al FG, a veces, presentaban estos cambios ultraestructurales asociados con la incorporación del marcador (del Cerro y cols., 1990).

El FG produce un claro, duradero e intenso marcaje sin que se haya podido demostrar efecto tóxico alguno sobre las neuronas marcadas (del Cerro y cols., 1990). Sus múltiples propiedades así como sus más recientes y nuevas aplicaciones han hecho que sea cada vez más utilizado no sólo en estudios neuroanatómicos, sino que también se ha mostrado útil en investigación neurobiológica (del Cerro y cols., 1988; Snyder-Keller, 1988; Crews y Wigston, 1990; Rinaman y cols., 1991; Sauer y Oertel, 1994).



TOXINA BOTULINICA

1. Naturaleza y mecanismo de acción

El microorganismo anaerobio y gram-positivo *Clostridium botulinum* produce ocho exotoxinas de similar peso molecular, estructura y acción farmacológica, que son distinguibles inmunológicamente y se denominan A, B, C₁, C₂, D, E, F y G (Simpson, 1981, Melling y cols., 1988). Los tipos A, B y E, están comunmente asociados con toxicidad en humanos (Ellenhorn y Barceloux, 1988). La toxina botulínica tipo A (TxBA) fué la primera que se obtuvo en forma cristalizada, estable y altamente purificada (Schantz y Scott, 1981; Scott, 1981). La forma cristalizada de la TxBA es una proteína de alto peso molecular (900.000 daltons) que consta de dos subunidades que se disocian en solución. Cada subunidad (450.000 daltons) está constituida por tres cadenas peptídicas de igual peso molecular (150.000 daltons); en una cadena peptídica reside su actividad tóxica, mientras que las otras dos son péptidos no tóxicos. La cadena peptídica tóxica está constituida por una unidad pesada (100.000 daltons) y una unidad ligera (50.000 daltons) unidas por puentes disulfuro. Una de las dos cadenas no tóxicas tiene actividad de hemoaglutinación (DasGupta, 1989; Osako y Keltner, 1991).

La TxBA es una potente neurotoxina que inhibe la liberación de acetil-colina (ACh) en el terminal presináptico de la unión neuromuscular de forma duradera y prolongada, produciendo de ese modo una parálisis flácida reversible (Burgen y cols., 1949; Scott y cols., 1973; Stanley y Drachman, 1983). En 1949, Burgen y cols., tras realizar una serie de experimentos en preparaciones de nervio frénico de la rata, demostraron definitivamente que la TxBA bloquea la transmisión neuromuscular, acabando con la controversia de autores anteriores sobre si el efecto paralítico de la TxBA ocurría central o periféricamente. Si es inyectada

intramuscularmente, la TxBa alcanza el terminal nervioso y ejerce su acción en tres pasos: i) unión rápida y estable a los receptores de superficie del terminal nervioso colinérgico. Esta unión a las áreas no mielinizadas del terminal nervioso está mediada por la unidad pesada de la cadena peptídica tóxica (Melling y cols., 1988); ii) internalización de la toxina desde la membrana del terminal al compartimento intracelular, probablemente por un proceso activo de micropinocitosis (Dolly y cols., 1984); iii) parálisis del músculo por la inhibición de la liberación de ACh, ya que interfiere con el proceso de exocitosis de las vesículas sinápticas y de este modo previene la liberación de ACh a la hendidura sináptica de la unión neuromuscular (Simpson, 1989; Dolly, 1992). Este efecto no es debido a la interferencia con la propagación del impulso nervioso (no bloquea la propagación del impulso nervioso: ni el nervio ni el músculo sufren deterioro de la conductibilidad o excitabilidad eléctrica) o a la inhibición de la síntesis o almacenamiento de ACh. Además, la TxBa no bloquea la entrada de calcio al terminal nervioso (Dreyer y cols., 1983; Melling y cols., 1988) ni interfiere la liberación "non-quantal" de ACh, bloqueando específicamente la liberación "quantal" de la misma (Stanley y Drachman, 1983). Se piensa, que la TxBa se une a las vesículas que contienen ACh en el terminal nervioso y previene la exocitosis calcio-dependiente de éstas (Sellin, 1985).

Actualmente está bien establecido que la TxBa es un bloqueante presináptico de la transmisión mediada por ACh, sin embargo no es bien conocido su mecanismo de acción preciso (Moreno-López y cols., 1994). Recientes estudios bioquímicos indican que la TxBa puede actuar *in vivo* como una proteasa que divide selectivamente proteínas de los terminales presinápticos que son esenciales para el proceso de fusión de las vesículas con las áreas donde se liberan en la membrana presináptica y por lo tanto, no se produce la subsecuente liberación del neurotransmisor (Schiavo y cols., 1992; Blasi y cols, 1993).

El efecto paralítico de la TxBa es dosis-dependiente y no inmediato, teniendo su pico de acción de 5 a 7 días después de la inyección intramuscular (Scott, 1981; Magoon, 1986; Elston, 1988). Histopatológicamente, el músculo denervado muestra atrofia y un grado medio de cambios desmielinizantes en el terminal nervioso, con regeneración subsecuente que se caracteriza por formaciones en bulbo de cebolla y brotes o retoños en el terminal nervioso de la unión neuromuscular (Scott, 1981). Al cabo de 6-9 meses revierten completamente los efectos de la TxBa, pero el músculo inyectado puede o no puede recuperar el nivel de función que tenía antes de la inyección (Scott, 1989a).

Cuando se administran dosis sistémicas tóxicas, la TxBa estimula una potente respuesta de anticuerpos, pero pequeñas dosis de la misma, no producen una respuesta inmune detectable (Elston, 1988).

2. Estudios funcionales y efectos axotomy-like

Burger y cols. (1949) en preparaciones de diafragma y nervio frénico de la rata documentaron que la parálisis producida por la toxina botulínica era debida al bloqueo neuromuscular. Así mismo, señalaron que fué necesaria una dosis 500 veces mayor de toxina botulínica tipo B que de TxBa para producir dicha parálisis en la rata. Estos autores también observaron que tras la administración de la toxina, la conducción nerviosa no estaba afectada y el músculo respondía normalmente a la estimulación directa.

Watson (1969) documentó cambios metabólicos (bioquímicos) en las neuronas del núcleo del nervio hipogloso tras la inyección de TxBa en la lengua de la rata adulta, similares a los que se producían tras la axotomía. Así, observó que la síntesis de ARN ribosómico por la neurona, se incrementaba, como ocurría después de la sección nerviosa crónica (Watson, 1968). En su trabajo de 1969, Watson

también señaló, que tras la inyección de TxBa, no se producía un acúmulo de células microgliales alrededor de las neuronas afectadas y sugirió que este hecho reflejaba que el sistema para el transporte intraaxonal estaba intacto tras la administración de TxBa. Anteriormente, Watson (1965) había observado que tras la axotomía, se producía un acúmulo regional de glía alrededor de las neuronas y postuló que era una respuesta a un gran defecto en el transporte axoplásmico. Se concluyó, que aunque en ambas circunstancias (axotomía y TxBa) hay una pérdida de contacto funcional efectivo entre la neurona y el músculo, después de la inyección de TxBa no se interrumpe el flujo axoplásmico, aunque esté inhibida la liberación de ACh (Watson, 1969).

Sumner (1977) estudió los efectos ultraestructurales que se producían en las neuronas del núcleo del hipogloso 35 días después de la inyección de TxBa en la lengua de la rata. Este autor observó en dichas motoneuronas: i) Una disminución del número de botones somáticos y del neuropilo, debida a la pérdida de botones con sinapsis simétricas y con vesículas sinápticas esféricas y claras; ii) una disminución del número de procesos dendríticos en el neuropilo; iii) un aumento en la proporción de dendritas y botones con inclusiones inusuales que sugieren retracción de procesos; iv) un aumento en la proporción de procesos que eran inusualmente electronodensos; v) un incremento del número de astrocitos y de procesos lamelares de astrocitos alrededor de las zonas libres de botones; vi) la presencia ocasional de microglía; vii) la sustancia de Nissl era normal en apariencia y abundancia. También señaló que estos cambios o respuestas de las neuronas del hipogloso eran similares a los que se producían 35 días después de la sección del nervio hipogloso (Sumner y Sutherland, 1973; Sumner 1975a,b).

Kristensson y Olsson (1978) estudiaron si la interrupción de la actividad sináptica in vivo, podía influir en el transporte retrógrado de moléculas, tales como la peroxidasa de rábano (HRP). Estos autores, para bloquear la transmisión nerviosa,

inyectaron TxBa en la región izquierda de los músculos de los vibrissae de ratones y posteriormente administraban HRP, bien en ambos lados de los músculos de los vibrissae o vía intravenosa. En todos los casos observaron que la incorporación de la HRP en las organelas del axón terminal y su transporte retrógrado al soma de las neuronas del núcleo del facial ocurría normalmente, en contra de sus expectativas iniciales, ya que estos autores habían postulado que si la TxBa afectaba la exocitosis, también estaría inhibida la endocitosis compensatoria debida al reciclaje de membranas y, por tanto, el transporte de macromoléculas como la HRP, que son captadas por un mecanismo de endocitosis.

Duchen y Strich (1968), observaron que tras la inyección intramuscular de TxBa en ratones, ocurre una extensa aparición de brotes axonales en el terminal axonal motor. Watson (1969), confirmó en su estudio este hecho, y observó la aparición de brotes en la porción terminal del axón motor 6 días después de la inyección de TxBa, haciéndose más extenso entre 18 y 30 días. Este autor señaló que transcurridos 100 días de la administración de la toxina, el patrón normal de inervación muscular no estaba totalmente restaurado. También postuló que en ambas circunstancias, la aparición de brotes axonales estaba asociada con el incremento de la síntesis de ARN ribosómico (Watson, 1969).

Holland y Brown (1981), también observaron este crecimiento nervioso en el terminal axonal motor de músculos inyectados con TxBa en el ratón y postularon que la recuperación de la parálisis después de la administración de TxBa es lenta porque la formación de nuevos contactos sinápticos por los brotes del terminal motor es también lenta, es decir, existe una dificultad para formar nuevas uniones neuromusculares.

Pinter y cols. (1991) inyectaron TxBa en el músculo gastrocnemius del gato y observaron que las propiedades eléctricas de las motoneuronas espinales presentaban cambios cuantitativamente similares, aunque más atenuados, que los

observados tras la axotomía. Sin embargo, no observaron tras la administración de TxBA cambios en la velocidad de conducción axonal.

Moreno-López y cols. (1994) estudiaron las alteraciones electrofisiológicas inducidas por la TxBA, tras su inyección en el músculo RL, en las motoneuronas del núcleo del VI par craneal del gato adulto. Estos autores documentaron que la respuesta de dichas motoneuronas a la TxBA se parece en varios aspectos a la observada tras axotomía, durante los 10 primeros días tras su administración, para diverger posteriormente de forma marcada, así mismo observaron que la actividad de las motoneuronas del núcleo del VI par mostraba profundas alteraciones en sus características de descarga, más de dos meses después de la inyección de la toxina.

Según Moreno-López y cols. (1994), la diferente respuesta de las motoneuronas del núcleo del VI par a la inyección de TxBA y a la axotomía sugiere, que la TxBA no actúa solamente en el terminal presináptico (bloqueando la transmisión neuromuscular, en común con la axotomía), sino que también tendría una acción a nivel somático, donde ha sido identificada la TxBA y donde se supone que llega por transporte retrógrado (Welhöner, 1989).

Aunque estos estudios previos sugieren que la inyección intramuscular de TxBA no daña directamente los axones o terminales motores (Simpson, 1989), y que la población de motoneuronas que inerva al músculo inyectado sufre alteraciones similares a las observadas después de daño axonal (Watson, 1969; Summer y Watson, 1971; Pinter y cols., 1991; Moreno y cols., 1994), se desconoce todavía si la administración intramuscular de TxBA puede tener algún efecto sobre la supervivencia de la población de motoneuronas que inervan la musculatura extrínseca del globo ocular.



3. Uso clínico de la toxina botulínica

La TxBA produce una parálisis flácida reversible debido al bloqueo mantenido de la transmisión del impulso nervioso en la unión neuromuscular. Por ello, la inyección intramuscular de esta sustancia ha sido recientemente utilizada como alternativa al tratamiento quirúrgico en el manejo de estrabismos y de desórdenes neuromusculares caracterizados por contracciones involuntarias, tales como el blefaroespasma y el espasmo hemifacial (Scott, 1981; Scott y cols., 1985; Savino y cols., 1985; Osako y Keltner, 1991).

La TxBA está comercializada para su uso clínico por Laboratorios Allergan, en forma de liofilizado con el nombre de Allergan Botox^R. El preparado contiene 100 unidades de toxina botulínica tipo A, 0,5 mg de albúmina sérica humana y 0,9 mg de cloruro sódico. Para reconstituir el liofilizado se utiliza solución salina estéril al 0,9% sin conservantes. Una vez reconstituido el vial se recomienda administrar el fármaco durante las 4 horas siguientes a la dilución, ya que la TxBA se deteriorará al cabo de unas pocas horas (Dunlop y cols., 1988).

La TxBA es definida para su uso clínico, en unidades basadas en la estimación de la dosis intraperitoneal letal media (DL50) en el ratón. Una unidad de Allergan Botox^R reconstituido corresponde a la DL50 en el ratón (Hoffman y Helveston, 1986; Scott, 1988). La DL50 para el hombre se estimó aproximadamente en 39 unidades/Kg de peso corporal (Scott, 1987, 1989b). Cuando la toxina es inyectada específicamente en un músculo ocular, se une rápida y firmemente a ese músculo, permitiendo que sólo mínimas dosis de ésta pasen al sistema circulatorio y que no causen por lo tanto efectos sistémicos (Scott, 1981).

3.1. En el tratamiento del estrabismo

3.1.1. Antecedentes históricos

El botulismo o envenenamiento sistémico por la ingestión de toxina botulínica, causa síntomas oculares tales como trastornos visuales, debidos a la parálisis de la musculatura intrínseca del ojo y diplopia, por parálisis de la musculatura extraocular. Scott y cols. (1973) observaron estas propiedades de la toxina botulínica y en su intento de encontrar una alternativa farmacológica al tratamiento del estrabismo, utilizaron por primera vez la TxBA para paralizar los músculos extraoculares del mono.

La idea de inyectar un agente farmacológico en los músculos extraoculares del humano con el fin de producir una prolongada o permanente paresia, fué concebida por Behrens, quien administró alcohol en dichos músculos. Sus estudios no prosiguieron debido a los malos resultados iniciales, ya que esta sustancia usualmente era inefectiva o causaba una parálisis muscular permanente (Scott y cols., 1973).

Scott y cols. (1973) evaluaron los efectos de la inyección de TxBA en los músculos extraoculares del mono, y documentaron que la TxBA era una droga ideal para producir debilitamiento transitorio de los músculos extraoculares y cambios permanentes de la alineación ocular sin serios efectos colaterales. También señalaron que el efecto inicial y la duración de la denervación por TxBA era dosis-dependiente y podría ser reducido administrando de 0-30 minutos tras su inyección, antitoxina en el músculo tratado. Ante tales resultados, después de la determinación de la dosis adecuada y de una amplia experimentación en monos, pasó a probarse la TxBA en humanos.

Aunque los estudios preliminares en humanos (Scott, 1980a,b) documentaron que la TxBA podría ser usada como una alternativa a la cirugía del estrabismo, la

difusión y aplicación clínica de esta técnica en el hombre debemos situarlas en los últimos 15 años. A pesar de que en los primeros años se utilizó, como muchas innovaciones, para el tratamiento de todo tipo de alteraciones oculomotoras, y que se obtuvieron unos resultados no demasiados satisfactorios, poco a poco, están apareciendo indicaciones más precisas y se ha mejorado la técnica, por lo que los resultados actuales son mucho mejores, y es una modalidad de tratamiento segura y efectiva en pacientes correctamente seleccionados (Lee y Elston, 1988; Magoon, 1989; Scott y cols., 1990; Gómez de Liaño y cols., 1991).

3.1.2. Indicaciones. Ventajas e inconvenientes. Complicaciones

Actualmente la TxBA constituye una alternativa a la cirugía del estrabismo en los siguientes casos: i) en determinados casos de estrabismo no paralítico; ii) con finalidad diagnóstica y como técnica complementaria a la cirugía en formas complejas de estrabismo horizontal y vertical, en las que tratamos parte del estrabismo con inyecciones de TxBA y la otra con cirugía; iii) en pacientes con pequeñas desviaciones residuales tras la cirugía; iv) en pacientes que no quieren ser intervenidos; v) en las parálisis oculomotoras, sobre todo en la del VI par craneal, bien en la fase aguda, para evitar la contractura del antagonista, o en la fase crónica fundamentalmente como técnica coadyuvante a la cirugía; vi) otras indicaciones menos habituales serían pequeñas desviaciones en pacientes distiroideos, o algunas desviaciones que aparecen tras la cirugía del desprendimiento de retina (Osako y Keltner, 1991; Gómez de Liaño, 1995).

La indicación de la utilización de TxBA en el estrabismo no paralítico, está en función de una serie de parámetros como la magnitud del ángulo de desviación, el tipo de estrabismo (convergente, divergente o vertical), la edad del paciente, la refracción, etc (Gómez de Liaño, 1995). Esta técnica es especialmente útil para ángulos estrábitos por debajo de las 40 dioptrías prismáticas (Scott, 1989b). Se ha

documentado que, dentro de los estrabismos horizontales, las esotropías responden mejor a la TxBA que las exotropías, y los niños, mejor que los adultos (Scott, 1989b; Osako y Keltner, 1991).

El cambio en la alineación ocular que se produce después de inyectar TxBA en los músculos extraoculares, es menos predecible y no tan estable como el que se produce tras la cirugía tradicional del estrabismo (Flanders y cols., 1987; Biglan y cols., 1989; Scott, 1989b). En un 60% de los casos se requiere repetir las inyecciones para determinar la dosis óptima y obtener de esa manera un máximo beneficio (Scott, 1989b). Como ocurre con el tratamiento quirúrgico del estrabismo, los mejores resultados con TxBA se obtienen cuando hay fusión, ya que ésta estabiliza la alineación, así mismo, los resultados demuestran que la cirugía es más fiable que la inyección de TxBA especialmente en grandes ángulos, donde no se espera que la fusión estabilice la desviación (Scott, 1989b).

La inyección en los músculos extraoculares de TxBA en el adulto, se realiza tras la instilación de un anestésico tópico, mientras que en los niños, además del anestésico tópico, se administra Ketamina i.v. (0,5-1mg/kg de peso) o más frecuentemente, la inhalación de protóxido de nitrógeno (Gómez de Liaño, 1995). La inyección debe ser puesta en el músculo deseado, ayudándonos siempre de un electromiógrafo al que se conecta una aguja monopolar de 27G y 35 mm de longitud. Cuando la aguja es insertada transconjuntivalmente en el músculo diana, se obtiene una señal electromiográfica audible, y cuando esta señal es máxima indica que la aguja está correctamente situada en el músculo y que se puede inyectar la TxBA. La dosis utilizada habitualmente es de 2,5-7,5 unidades por músculo inyectado, generalmente en un volumen que oscila entre 0,05-0,15ml.

La utilización de esta técnica presenta ciertas ventajas como el ser innecesaria la hospitalización del paciente, así como la ausencia de cicatrices conjuntivales y musculares e inflamación postoperatoria, así mismo su uso no

impide una intervención quirúrgica posterior si los resultados no son satisfactorios (Scott, 1989b, Gómez de Liaño, 1995).

La mayoría de las complicaciones que se producen son transitorias, entre ellas destaca por su frecuencia la ptosis palpebral, por difusión de la TxBA desde el lugar de inyección al músculo elevador del párpado superior, que en todos los casos se resuelve espontáneamente. Otra complicación sería la desviación vertical que se produce cuando la toxina inyectada difunde a los músculos adyacentes (Scott, 1989b, Gómez de Liaño, 1995). No se han encontrado manifestaciones sistémicas por la utilización intramuscular de la TxBA (Scott, 1980b; Lee y Elston, 1988; Magoon, 1989; Scott y cols., 1990; Gómez de Liaño y cols., 1991).

3.1.3. Mecanismo de acción

La parálisis flácida transitoria que se produce en el músculo inyectado, tras la administración de TxBA, dura habitualmente de 4 a 8 semanas. Esta situación conduce a una hipercorrección transitoria del estrabismo, que se recupera lentamente en un plazo de 8 a 24 semanas (Scott, 1980b; Elston, 1988; Gómez de Liaño y cols., 1991).

Durante el período de parálisis muscular, se producen modificaciones estructurales tanto en el músculo inyectado, que sufre un alargamiento o debilitamiento, como en su antagonista ipsilateral, donde encontramos signos clínicos de contractura muscular, así como consecuencias sensoriales, que siguen en fase de estudio, y que son la clave del efecto corrector del estrabismo. En el músculo inyectado se produce un proceso de denervación focal, se encuentran signos de hipersensibilidad por denervación, atrofia con desintegración focal de miofibrillas y alteraciones mitocondriales focales, afectándose en mayor grado las fibras monoinervadas orbitarias (Spencer y McNeer, 1987). Las modificaciones sensoriales son consecuencia del período de hipercorrección y probablemente de las alteraciones

propioceptivas que induce la situación de parálisis. Se produce por lo tanto un fenómeno de debilitamiento-contractura-alteración sensorial, que induce modificaciones en los pares de fuerzas antagónicas y resulta en una corrección del ángulo del estrabismo (Spencer y McNeer, 1987; Gómez de Liaño, 1995; Gómez de Liaño y cols., en prensa).

3.2. En el tratamiento del blefaroespasmó y el espasmó hemifacial

El blefaroespasmó esencial benigno y el espasmó hemifacial son alteraciones neuromusculares, no infrecuentes, que se caracterizan por violentas contracciones involuntarias de los músculos orbiculares o de un grupo de músculos de la cara entre los que se encuentra el músculo orbicular, produciendo a menudo incapacidad para realizar ciertas actividades cotidianas como conducir o leer (Scott y cols., 1985).

La etiología del blefaroespasmó es desconocida, aunque se postula que podría ser el resultado de una disfunción orgánica del tronco cerebral rostral (Jankovic y Ford, 1983). El espasmó hemifacial se debe generalmente a la compresión vascular del nervio facial en el ángulo pontocerebeloso, pudiendo ser frecuentemente tratado con descompresión microvascular quirúrgica (Loeser y Chen, 1983). Otros tratamientos para estas alteraciones incluyen, la administración sistémica de fármacos que alteran la función del sistema nervioso central y la excitabilidad nerviosa, la sección quirúrgica de ramas nerviosas del facial, la miectomía quirúrgica de los músculos orbiculares y la administración intramuscular local de TxBA. Cada uno de estos tratamientos tienen sus desventajas, incluidos resultados insuficientes y recurrencias (Patrinely y cols., 1988).

Las inyecciones de TxBA para el tratamiento del blefaroespasmó fueron empleadas por primera vez en 1983 (Frueh y cols., 1984; Jankovic, 1988). Estos autores documentaron que la denervación química del músculo orbicular que

producía esta sustancia era temporal y se requerían reinyecciones periódicas para controlar las contracciones espasmódicas de los párpados. Actualmente se ha convertido en el tratamiento de primera elección para el blefaroespasma (Osako y Keltner, 1991). El efecto máximo de la toxina ocurre en unos pocos días, y la mejora del espasmo dura cerca de tres meses (Scott, 1987). La mayoría de los pacientes toleran los efectos colaterales transitorios y cuando recurre el espasmo prefieren la reinyección de la TxBa a los tratamientos alternativos, ya que éstos tienen frecuentes complicaciones y no están exentos de recidivas (Osako y Keltner, 1991).

Algunos autores documentan que el intervalo libre de espasmo y la intensidad de la parálisis están relacionados con la dosis de TxBa (Scott y cols., 1985; Scott, 1989a). Sin embargo, altas dosis de TxBa incrementan los efectos colaterales que se producen por difusión de la toxina a los músculos extraoculares, tales como ptosis y diplopia, con sólo pequeños incrementos en la duración del intervalo libre de espasmo (Scott, 1987).

De todos los tratamientos del espasmo hemifacial, la descompresión microvascular quirúrgica es el más exitoso y el 88% de los pacientes curan, con una tasa de recurrencias menor al 10% (Jannetta, 1981). Sin embargo tiene complicaciones severas como sordera, parálisis facial permanente, otitis media y hemorragia intracraneal entre otras (Loeser y Chen, 1983). Aunque la descompresión quirúrgica puede ser la forma definitiva de tratamiento, las inyecciones de TxBa son efectivas en el control del espasmo hemifacial, especialmente cuando recurre el espasmo tras un procedimiento quirúrgico. La duración del efecto tras la administración de TxBa para el tratamiento de esta alteración, es de aproximadamente cuatro meses (Savino y cols, 1985; Scott, 1987), apareciendo diplopia más frecuentemente que cuando se trata el blefaroespasma (Scott, 1987). No han sido documentados efectos sistémicos de la TxBa tras el tratamiento de estos trastornos neuromusculares (Osako y Keltner, 1991).

La diferente respuesta al tratamiento con TxBA del estrabismo y estos trastornos neuromusculares podría ser debida a las claras diferencias entre el músculo orbicular de los párpados y los músculos extraoculares, tanto en los tipos de fibras musculares que los constituyen, como en las características funcionales de sus sistemas motores control (Porter y cols., 1991). Estos autores documentaron que tras la inyección de TxBA en el músculo orbicular de monos adultos, se producía una atrofia no selectiva y difusa de las fibras musculares, así mismo señalaron que estas alteraciones ultraestructurales del músculo orbicular eran reversibles y no tenían aparentemente consecuencias a largo plazo. Estos cambios contrastan con las alteraciones a largo plazo y en un tipo de fibras específico, inducidas por la TxBA en los músculos extraoculares (ver apartado 3.1.3.).

DOXORRUBICINA

1. Naturaleza y Mecanismo de acción

La doxorubicina (DXR) es un antibiótico antitumoral perteneciente al grupo de las antraciclinas, aislado de cultivos de *Streptomyces peucetius*, variedad *ceasius* (Yamamoto y cols., 1984b), cuya acción citotóxica se atribuye a que se intercala entre la doble hélice de la estructura del ADN, e inhibe indirectamente la producción de proteínas vitales porque disminuye la síntesis de ARN mensajero (Pigram y cols., 1972; Dimarco, 1975).

La DXR, también conocida como adriamicina (Bigotte y Olsson, 1982, 1983; Yamamoto y cols., 1984b), es usada comúnmente en el tratamiento de neoplasias malignas (Blum y Carter, 1974). Su administración se realiza por inyección intravenosa y, en caso de tratamiento localizado de los tumores, por infusión endoarterial lenta. Entre sus efectos secundarios destacan la mielodepresión y la cardiotoxicidad. Esta última se debe a que la DXR produce alteración del retículo sarcoplásmico y de otras estructuras que regulan el flujo del Ca^{++} en el músculo esquelético y cardíaco. Estudios en animales de experimentación demuestran que la toxicidad de esta droga está en función de su concentración tisular, y que si se administra sistémicamente, la concentración que alcanza en el músculo gastrocnemius es solamente el 17% de la que se alcanza en el músculo cardíaco (Doroshov y cols., 1985). Así mismo, en estudios de cultivos tisulares se observó que la toxicidad de la DXR era directamente proporcional a la concentración intracelular de la droga (Bellamy y cols., 1988; Hindenberg y cols., 1989).

Estudios farmacocinéticos, han documentado que se produce una rápida reducción de los niveles plasmáticos de DXR tras su administración intravenosa, acompañada, por otro lado, de una lenta excreción urinaria y biliar, debida

probablemente a la fijación del fármaco a nivel de los tejidos. La excreción biliar representa la principal vía de eliminación, y es en 7 días, equivalente al 40-50% de la dosis administrada, lo que explica su efecto hepatotóxico. La eliminación urinaria es, en 5 días, aproximadamente igual al 5% de la dosis administrada (Baker y Wirtschafter, 1987). Se han demostrado efectos mutagénicos y carcinogénicos de la DXR en animales de experimentación (Bucciarelli, 1988).

La DXR no atraviesa la barrera hematoencefálica (Bigotte y Olsson, 1982), no habiendo sido demostrada su toxicidad en el sistema nervioso central cuando se administra por vía intravenosa (Philips, 1975; Cho, 1977). Investigaciones experimentales muestran, sin embargo, que esta droga puede tener tras su administración por esta vía, efectos tóxicos sobre los ganglios nerviosos periféricos, que son regiones desprovistas de una barrera de difusión vascular (Cho, 1977; Cho y cols., 1980)

La DXR es un compuesto moderadamente lipofílico, que presenta fluorescencia específica rojo-anaranjada (Egorin y cols., 1974; Egorin y cols., 1980). Estudios en animales de laboratorio documentaron que esta droga fluorescente, aplicada en el músculo, o directamente en nervios motores (Bigotte y Olsson, 1983; Yamamoto, 1984b) o sensoriales (Kato y cols., 1988) periféricos, puede ser transportada retrógradamente por flujo axoplásmico y causar la muerte de las neuronas origen de los axones que constituyen dichos nervios. Esto ocurre sin daño significativo de estructuras adyacentes del sistema nervioso central. Parece que no existe transporte trans-sináptico de la DXR (Yamamoto y cols., 1984b). Además, cuando esta sustancia es aplicada en el músculo, causa muerte de células musculares (Baker y Wirtschafter, 1987; McLoon y Wirtschafter, 1988).

2. Transporte suicida axoplásmico: Antecedentes históricos

La DXR cuando es transportada retrógradamente por los axones, es la única sustancia conocida que combina propiedades de trazador fluorescente con una acción neurotóxica (Bigotte y Olsson, 1983). Esta acción, conocida como "transporte suicida", fué observada por Wiley y cols. (1982), con otras sustancias, pero a diferencia de la DXR, ninguna actuaba como trazador. Otros marcadores fluorescentes (Kuypers y cols., 1977; Bentivoglio y cols., 1980a,b) que pueden ser transportados retrógradamente, no producen efectos citotóxicos descritos en las neuronas diana.

La primera demostración de degeneración neuronal experimental por una sustancia tóxica transportada por flujo axoplásmico retrógrado, fué comunicada por Harper y cols. en 1980. Esta sustancia era la ricina, una lectina extremadamente venenosa. Su inyección en la glándula submandibular o en la cámara anterior del ojo en ratones producía una cromatolisis de neuronas en el ganglio cervical superior. Posteriormente, en 1982, Wiley y cols. confirman el transporte suicida de tres lectinas tóxicas (ricina, abrina y modeccina), tras su inyección subepineural en el nervio hipogloso. La aplicación de estas lectinas en el nervio trigémino o en el nervio ciático, produce una destrucción completa de las células de los ganglios sensoriales que proyectan en estos nervios (Yamamoto y cols., 1983, 1984a).

Bigotte y Olsson, en 1982, demostraron que la DXR se transporta retrógradamente al cuerpo celular de las neuronas del núcleo del hipogloso, tras haber sido inyectada en la lengua del ratón. Estos autores además observaron, que por razones desconocidas aparecían unas pocas células gliales, alrededor de las neuronas marcadas, que también contenían la droga fluorescente. Bigotte y Olsson (1983) también observaron cambios degenerativos en el núcleo del hipogloso del ratón, pero no constataron la desaparición de somas neuronales. Yamamoto y cols.

(1984b) documentaron por primera vez muerte neuronal, tanto en el ganglio raquídeo dorsal como en el asta anterior de la médula espinal de la rata, tras la administración de DXR en el nervio ciático.

3. Efectos neurotóxicos: Degeneración selectiva de neuronas

3.1. Cambios ultraestructurales

En 1983, Bigotte y Olsson estudiaron los cambios morfológicos que ocurren en las neuronas del núcleo del nervio hipogloso debido al transporte retrógrado de DXR tras su inyección intramuscular en la lengua del ratón. Estos autores describieron una serie de cambios tempranos, más obvios entre las 24 horas y los 3 días tras la inyección de la DXR, que consistían en que los núcleos de las neuronas, al ser observados con microscopio óptico, presentaban múltiples áreas focales de rarefacción de la cromatina, que les daba un aspecto apolillado. Cuando estudiaron los núcleos con microscopía electrónica, también evidenciaron alteraciones en el nucléolo, tales como segregación nucleolar (Lambertenghi-Deliliers, 1972), fragmentación del mismo (Lambertenghi-Deliliers, 1972; Merski y cols., 1976) y pérdida de su apariencia redondeada. A los 14 días de la inyección, unidos a los cambios precoces nucleares, observaron alteraciones en el citoplasma de algunas neuronas que consistían en que su citoplasma presentaba vacuolas claras y otras zonas intensamente teñidas, y el núcleo de algunas células estaba desplazado periféricamente. El estudio con microscopía electrónica de estas neuronas demostró una distribución anormal de los ribosomas. Estos autores también encontraron, cuando el período de supervivencia era mayor a 3 días, que se producía rarefacción de la cromatina nuclear y vacuolización del citoplasma en astrocitos adyacentes a las neuronas anormales. Por último, evidenciaron que el número de neuronas

afectadas era mayor cuando se inyectaba mayor dosis de DXR en la lengua, sin embargo, los cambios morfológicos eran cualitativamente los mismos en todos los animales, independientemente de la dosis recibida. Estos autores no observaron en este estudio, sin embargo, que se produjera en ningún caso muerte neuronal.

3.2. Explicación de los cambios ultraestructurales

Se ha postulado que los cambios vistos en el núcleo 24 horas después de que la droga fuera inyectada, están morfológicamente correlacionados con la ruptura inducida en el ADN cromosómico al intercalarse la DXR en la doble hélice de su estructura (Vig, 1971; Schwartz, 1975) y que las alteraciones nucleolares asociadas probablemente representen una inferencia secundaria de la DXR en la síntesis ADN-dependiente de ARN que normalmente tiene lugar en el nucléolo (Bigotte y Olsson, 1983). En algunas circunstancias, se ha observado que los cambios nucleolares pueden ser reversibles como, por ejemplo, en las células hepáticas (Lambertenghi-Deliliers, 1972; Merski y cols., 1976). Sin embargo, en las neuronas del núcleo del nervio hipogloso persistían dichos cambios 14 días después de la administración de DXR, acaso debidos a la incapacidad de éstas para reparar el ADN con permanente interferencia en la síntesis del ARN nucleolar (Bigotte y Olsson, 1983).

Olson y cols. (1974) han postulado que las vacuolas citoplasmáticas vistas en las neuronas del núcleo del hipogloso, se podrían deber a que la DXR puede incrementar la permeabilidad de la membrana celular. La desaparición de los ribosomas y la alteración de su distribución en rosetas podrían ser secundarias a los cambios nucleolares (Lambertenghi-Deliliers y cols., 1976). Así mismo, la pérdida de la distribución normal en rosetas de los ribosomas podría ocasionar una alteración

funcional, pues Palay y cols. (1974) han observado que los ribosomas aislados no son activos en la síntesis de proteínas.

Parece razonable asumir que la principal lesión que produce la DXR, una vez que entra en las neuronas, es la alteración de las funciones del ADN y del ARN en el núcleo y en los ribosomas, como ha sido admitido en otros tipos de células (Brown, 1978).

Young (1975) atribuyó los cambios miocárdicos observados tras el tratamiento con DXR intravenosa en varias especies animales, a un efecto tóxico directo de la droga en la mitocondria. Cambios mitocondriales, tales como la balonización y la desorganización de la estructura interna, han sido observados también en las neuronas del núcleo del hipogloso de ratones a los que se inyectó DXR en la lengua (Bigotte y Olsson, 1983).

3.3. Muerte neuronal

Yamamoto y cols. (1984b) documentaron iguales cambios ultraestructurales a los observados por Bigotte y Olsson (1983), tanto en las neuronas de los ganglios raquídeos dorsales, como en las motoneuronas somáticas del asta anterior de la médula espinal a nivel lumbar (L_4 - L_6), tras inyectar DXR subepineuralmente en nervio ciático o intramuscularmente en el músculo soleus-gastrocnemius de la rata. Además, estos autores fueron los primeros en documentar la disminución del número de estas neuronas o fenómeno de muerte neuronal tras la administración de DXR, sin embargo, no realizaron un estudio cuantitativo del mismo. Estos autores demostraron también, con técnicas de microscopía de fluorescencia, que la llegada de la DXR al núcleo de las neuronas se producía a las 19 horas de su administración, en los ganglios raquídeos dorsales y 48 horas después de su administración, en el asta anterior de la médula espinal, apareciendo degeneración neuronal a los 4 días de la

inyección en las células ganglionares de los ganglios dorsales, tardando otros 4 días más para manifestarse en las neuronas motoras del asta anterior de la médula. Estos autores postularon, que el intervalo entre la incorporación de la DXR a las neuronas y la aparición de los cambios patológicos podrían ser explicados por el mecanismo de acción de la droga.

Yamamoto y cols. (1984b) documentaron que al final de la tercera semana tras la administración de la DXR en el nervio ciático, muchas motoneuronas somáticas del asta anterior de la médula espinal habían desaparecido, y también observaron neuronas degeneradas y una moderada proliferación astrocítica y oligodendrocítica en las columnas de motoneuronas, pero no infiltración celular inflamatoria. A los tres meses de la administración de DXR casi todas las neuronas motoras correspondientes al territorio del nervio ciático ipsilateral habían desaparecido, quedando una moderada gliosis y algunas neuronas marginales que presentaban cambios degenerativos en grado variable, desde heterocromatinización y cromatolisis central a vacuolización citoplásmica y desaparición del núcleo.

En los ganglios raquídeos dorsales, Yamamoto y cols. (1984b) encontraron que 8 días después de la administración de la DXR muchas neuronas estaban necróticas. Además, comunicaron que a menudo había proliferación de las células capsulares, y que 2 semanas o más después del tratamiento, la mayoría de las células ganglionares habían desaparecido, dejando grupos de células capsulares.

Yamamoto y cols. (1984b), por último, compararon las alteraciones observadas tras la administración de DXR en el nervio ciático, con aquellas que se producían tras la axotomía, y observaron, que 6 días después de la sección del nervio ciático, aparece una típica reacción axonal de las neuronas de los ganglios raquídeos ipsilaterales, pero no objetivaron pérdida neuronal en dichos ganglios, incluso tres meses después de la intervención.

4. Efectos miotóxicos: Pérdida de fibras musculares

4.1. Estudios en animales con doxorrubicina

Los efectos miotóxicos de la DXR han sido bien caracterizados (Doroshov y cols., 1985), y son en parte el resultado de la destrucción de organelas subcelulares en las fibras musculares, particularmente las proteínas contráctiles (Papoian y Lewis, 1990).

Baker y Wirtschafter en 1987, fueron los primeros en investigar el potencial de la DXR para producir miectomía química y denervación química en el músculo orbicular y otros músculos faciales. El objetivo de su trabajo era estudiar las alteraciones cutáneas, tales como ulceración severa y necrosis que pueden aparecer tras la administración de la DXR por vía subcutánea o intramuscular, ya que en publicaciones previas (Cohen, 1979; Sonneveld y cols., 1984; Bleicher y cols., 1984) se comunicaba la aparición de dichas alteraciones por extravasación de la droga tras terapia intravenosa. Estos autores inyectaron DXR en el párpado inferior y en los espacios antecubital y poplíteo de conejos y demostraron que la administración subcutánea de DXR produce un daño severo de la piel no facial, sin embargo el daño es menor en la piel de los párpados, donde además causa severa necrosis del músculo orbicular. Por todo ello, postularon que la piel de la cara, que tiene una capa de músculo estriado entre dos capas de tejido conectivo areolar, es capaz de resistir dosis de DXR que producirían alteraciones en otras áreas de la piel. Al observar Baker y Wirtschafter (1987) este daño muscular casi selectivo, que se manifestó como una atrofia marcada del músculo orbicular, 21 días tras la inyección de DXR, sugirieron que esta sustancia podría ser útil como una alternativa al tratamiento con TxBA en párpados y músculos faciales espásticos e incluso en el tratamiento del estrabismo.

McLoon y cols. (1991) documentaron que la inyección de DXR en el músculo orbicular del mono produce a dosis adecuadas, la destrucción permanente de más del 70% de las fibras musculares del párpado tratado, sin al parecer, ocasionar lesión de los nervios o tejidos circundantes. En experimentos posteriores, McLoon y cols. (1992) han observado una disminución progresiva del número total de fibras musculares, relacionada con la inyección de dosis crecientes de DXR en el orbicular de conejos y monos. Así mismo, cuando la DXR se administra después de una inyección de verapamil en ambas especies animales, se observó un sustancial incremento en la toxicidad muscular comparado con el que se observó tras la administración de DXR solamente (McLoon y cols., 1992). La inyección de verapamil y DXR causa pérdida muscular tanto en la región pretarsal como en la preseptal del músculo orbicular, mientras que la inyección de DXR, producía pérdida muscular significativa solamente en la región preseptal del orbicular. Estos autores han sugerido, que la explicación a este hecho se encontraría en la acción vasodilatadora del verapamil que ayudaría a incrementar la difusión de la DXR en el párpado inyectado, aumentando su disponibilidad en el músculo. El verapamil es un antagonista de los canales del Ca^{++} , usado en el tratamiento de la taquicardia supraventricular, que causa un incremento de la acumulación intracelular de DXR (Bruno y Slate, 1990), aumentando, por lo tanto, su miotoxicidad (McLoon y cols., 1992).

McLoon y cols. (1994) documentaron que la inyección de DXR en el orbicular del conejo no ocasionaba una disminución del número de motoneuronas del núcleo del facial, a pesar de la extensa pérdida muscular observada, y sugirieron, entre otras explicaciones a este hecho, la capacidad de estas neuronas para sobrevivir, en vez de degenerar, ante varios tipos de lesiones (La Velle y La Velle, 1958; Lieberman, 1971; McLoon y La Velle, 1981).

4.2. Estudio clínico experimental con doxorrubicina

Tras previas investigaciones en animales (Baker y Wirtschafter, 1987; McLoon y Wirtschafter, 1988) para determinar si la miectomía química que produce la DXR, podía constituir un tratamiento eficaz y seguro en los desórdenes espásticos musculares en general, y en el blefaroespasmó esencial benigno y el espasmó hemifacial en particular, Wirtschafter (1991) realizó el primer estudio clínico experimental de la administración de DXR en los músculos orbiculares superior e inferior de los párpados de pacientes que presentaban blefaroespasmó y espasmó hemifacial. Este autor incluyó en su estudio a 20 pacientes (12 con blefaroespasmó y 8 con espasmó hemifacial), previo consentimiento de los mismos, que habían tenido respuestas previas efectivas, aunque transitorias, al tratamiento con TxBA de sus alteraciones espásticas.

Wirtschafter (1991) postuló que a la concentración y dosis utilizadas era improbable lesionar el SNC, como resultado del transporte axonal retrógrado "suicida" de la DXR desde el músculo inyectado a las motoneuronas del núcleo del facial. Este autor también señaló, que se podía graduar tanto el efecto de destrucción muscular, seleccionando las fibras a inyectar, como la disminución de los efectos indeseables, seleccionando la dosis, la concentración y el lugar de inyección. Por último, documentó, que la inyección previa de hialuronidasa y el uso local del anestésico miotóxico bupivacaina, facilitaban la difusión de la DXR en los haces musculares, potenciando su efecto y por tanto necesitando menor dosis de la misma, por lo que disminuyen sus efectos tóxicos locales.

En el primer estudio clínico de este nuevo protocolo de tratamiento de pacientes con blefaroespasmó y espasmó hemifacial, inyectando dosis variables de DXR en sus párpados (Wirtschafter, 1991, 1994), el éxito en la reducción del espasmó muscular generalmente requería tres series de inyecciones de no más de 1.5

mg de DXR por párpado, con una dosis acumulativa máxima de 4 mg por párpado, así mismo, todos los pacientes que completaron el protocolo de tratamiento tuvieron una mejoría duradera de los síntomas (McLoon y cols., 1993).

La muestra para biopsia obtenida del párpado superior de un paciente, dos años después de finalizar su tratamiento con DXR, presentaba una pérdida casi total de fibras musculares del orbicular, excepto en un foco de músculo de la porción medial, apareciendo normales los elementos vasculares y nerviosos, así como otras estructuras anexas. No se identificaron signos de displasia ni cambios característicos de malignización, ni tampoco anomalías en el tejido conectivo, pero el párpado estaba más adelgazado (McLoon, y cols., 1993). Esta pérdida muscular permanente contrasta con los cambios musculares observados después de la inyección de TxBA en el párpado, donde tras una atrofia inmediata no se evidencian cambios musculares a largo plazo (Porter y cols., 1991).

4.2.1. Ventajas e inconvenientes del uso clínico de la doxorubicina

Wirtschafter (1991) postuló que la destrucción muscular producida por la DXR podría tener un mejor resultado en el tratamiento de estos desórdenes neuromusculares espásticos que la denervación química temporal que se consigue con la TxBA. Este autor sugirió que la eficacia de la DXR podría explicarse porque aparte de la lesión inmediata que produce, quedaría retenida en el tejido muscular el tiempo suficiente para dañar las células musculares satélite, ya que la destrucción del músculo requiere la eliminación tanto de las fibras musculares contráctiles como de las células musculares satélite, que se activan y dividen tras la lesión y son la fuente de regeneración del músculo lesionado.

Otra posible ventaja del tratamiento con DXR de estos desórdenes musculares espásticos sería la ausencia de complicaciones como la ptosis o la diplopia, debido a la mala difusión de esta sustancia. Sin embargo, tras el tratamiento con TxBA no es

infrecuente la aparición de ptosis o diplopia, por la difusión del fármaco a través del septum orbitario de los párpados superior e inferior, al músculo elevador del párpado superior o al músculo oblicuo inferior respectivamente (Wirtschafter, 1991). Por último, este autor concluyó que la TxBA, por su efecto de denervación química transitoria, podría ayudarnos a identificar aquellos pacientes que puedan beneficiarse de la miectomía química con DXR. Así mismo, la TxBA podría utilizarse simultáneamente a la DXR y entre las dosis de la misma en el tratamiento de estas alteraciones neuromusculares.

El principal inconveniente encontrado del uso clínico de la DXR para la miectomía química, es su potencial para producir lesiones en la piel como resultado de la toxicidad de la droga (McLoon y cols., 1992, 1995). Tanto en estudios animales (McLoon y Wirtschafter, 1988) como en humanos (Wirtschafter, 1991), la ulceración de la piel, en la zona de la inyección, ocurrió a las dosis más efectivas para la destrucción muscular, y además, la necesidad de repetidas inyecciones en esos pacientes para vencer el espasmo muscular incrementaba el riesgo de dicha complicación. McLoon y cols. (1992) sugirieron que se podría reducir la dosis y el número de inyecciones necesarias de DXR en los párpados, si se administraba previamente una droga, el verapamil, que podría amplificar los efectos miotóxicos de la DXR, y de esta forma se podría disminuir la incidencia de ulceración cutánea. Sin embargo, este tratamiento combinado no consigue reducir ni la incidencia ni la duración de las lesiones de la piel, mientras que la inyección de la droga inmunosupresora ciclosporina en los párpados, 20 minutos antes del tratamiento con la DXR, según McLoon y cols. (1995), retrasa el comienzo, reduce la duración y limita la extensión de las lesiones dérmicas en los párpados de conejos.



II. OBJETIVOS

OBJETIVOS

1. Desarrollar un modelo experimental que permita valorar con fiabilidad el efecto de determinadas sustancias neurotóxicas sobre la supervivencia de motoneuronas. Para conseguir este objetivo determinamos previamente:

i) La eficacia del fluoro-gold inyectado en el músculo recto lateral, para marcar la totalidad de la población de motoneuronas del núcleo del VI par craneal de la rata.

ii) La persistencia del fluoro-gold en las motoneuronas del núcleo del VI par, lo que nos permitirá realizar estudios experimentales a largo plazo, ya que el efecto tóxico de algunas sustancias podría tardar en manifestarse.

iii) Los posibles efectos sobre la supervivencia neuronal, del marcaje con fluoro-gold durante largos períodos de tiempo, ya que de existir, podrían superponerse a los de otras sustancias empleadas.

2. Investigar los efectos a corto y largo plazo de la administración de distintas dosis de toxina botulínica tipo A en el músculo recto lateral, sobre la supervivencia de las motoneuronas del núcleo del VI par craneal de ratas jóvenes.

3. Cuantificar los efectos neurotóxicos de la doxorubicina administrada en el músculo recto lateral de la rata, sobre la supervivencia de las motoneuronas del núcleo del VI par craneal. La doxorubicina es un agente neurotóxico bien conocido, por lo que podremos comparar sus efectos en las motoneuronas de este núcleo, con los de otros posibles neurotóxicos.

III. MATERIAL Y METODOS



MATERIAL Y METODOS

Para conseguir los distintos objetivos, hemos diseñado tres grupos experimentales. En el primer grupo queríamos determinar la eficacia del FG inyectado en el músculo recto lateral de la rata, como marcador retrógrado fluorescente de la población de motoneuronas del núcleo del VI par craneal, así como la persistencia a largo plazo del mismo en dichas motoneuronas y sus posibles efectos sobre las motoneuronas.

Posteriormente, una vez comprobado que disponíamos de un modelo experimental válido para identificar las motoneuronas del núcleo del VI par craneal, en un segundo grupo experimental estudiamos los efectos a corto y largo plazo de la administración intramuscular de distintas dosis de TxBA en dicha población.

Por último, se realizó un tercer grupo experimental que tuvo por objeto cuantificar los efectos neurotóxicos de la administración intramuscular de DXR, sobre la supervivencia de las motoneuronas del núcleo del VI par craneal.

1. Animales de experimentación y anestesia

Se han utilizado ratas machos y hembras del tipo Sprague-Dawley, de edades comprendidas entre 3 y 18 semanas, obtenidas del estabulario de la Universidad de Murcia. Todas las manipulaciones experimentales se han efectuado bajo anestesia general con hidrato de cloral al 7% en agua destilada, administrado por vía intraperitoneal, a una dosis de 0,42 mg/g de peso corporal, y siguiendo en todo momento las recomendaciones de la Unión Europea, de la Asociación de Investigación en Visión y Oftalmología (ARVO) y de la Sociedad de Neurociencia (Society for Neuroscience), para el uso de animales de investigación. Las ratas se

guardaban en el animalario de la Universidad de Murcia, donde eran alimentadas "ad libium" y se mantenían en habitaciones con temperatura controlada y con un ciclo de luz-oscuridad de 12 horas. La intensidad de luz variaba en un rango de 8 a 24 luxes.

El sacrificio de los animales se realizaba mediante la inyección intraperitoneal de una sobredosis del mismo agente anestésico.

2. Marcaje retrógrado con fluoro-gold

Una vez anestesiado el animal, se colocaba en un soporte de cartón, sujetándolo por sus cuatro extremidades con cinta adhesiva e inmovilizando la cabeza mediante una goma que pasábamos por debajo de los incisivos superiores. A continuación, rasurábamos la parte superior de la cabeza del animal y realizábamos una incisión media de la piel en dicha zona con hoja de bisturí que nos permitía tras la disección de tejidos, el acceso a la órbita en su vertiente superior externa. Una vez en la cavidad orbitaria, identificábamos y aislábamos cuidadosamente, pasando una cinta de algodón, el músculo recto lateral, inyectando en el vientre muscular el trazador neuronal fluoro-gold, con la ayuda de una microjeringa de Hamilton de 5 microlitros y aguja de 26S.

Todo el proceso quirúrgico se realizaba bajo control microscópico (Microscopio de Operaciones OPMI 11, Zeiss). Tras la intervención, la piel del cráneo del animal era suturada con seda de 5/0 (Ethicon), mediante sutura continua. Para evitar la desecación corneal en el período de reanimación anestésica, aplicábamos pomada oftálmica de tobramicina (Tobrex^R, Alcon) sobre la córnea de los dos ojos.

A todos los animales se les inyectó de forma lenta, 5 microlitros de fluoro-gold (FG, Fluorochrome inc., Englewood, Colorado) al 3% en CINA al 0,9%, conteniendo un 10% de dimetilsulfóxido, DMSO). Estudios preliminares que hemos

efectuado en el Laboratorio indican que, siete días después de la inyección de FG en el RE, las motoneuronas han transportado retrógradamente e incorporado el marcador a su citoplasma, obteniéndose en este período de tiempo, un marcaje óptimo del núcleo del VI par craneal.

3. Inyección de neurotoxinas

3.1. Toxina botulínica

A los animales se les administraron distintas dosis de toxina botulínica tipo A (TxBA, Allergan Botox^R, Allergan), disuelta siempre en un volumen de 5 microlitros de solución salina estéril. En todo momento se siguieron las instrucciones del fabricante con respecto a la utilización del preparado una vez reconstituido: Este debe ser utilizado en un período máximo de 4 horas, manteniéndolo en un refrigerador a una temperatura de 2-8°C, y evitando su agitación violenta o la formación de burbujas, ya que se desnaturaliza.

La inyección de la TxBA se realizó lentamente, y bajo control microscópico en el vientre muscular, tras el cuidadoso aislamiento del mismo y con la ayuda de una microjeringa de Hamilton de 5 microlitros y aguja de 26S.

3.2. Doxorrubicina

A los animales se les administraron distintas dosis de doxorrubicina (DXR, Farmiblastina^R, Farmitalia Carlo Erba, Madrid), disuelta en suero salino estéril. El volumen inyectado osciló entre 2,5-7,5 microlitros, dependiendo de la dosis de DXR. Una vez reconstituido el preparado, fué utilizado en las 3 horas siguientes a su

preparación. La solución reconstituida puede conservarse (preservándola de la luz) durante 24 horas a temperatura ambiente y durante 48 horas entre 4 y 8° C.

La inyección de DXR se realizó en el vientre muscular del RL izquierdo, de forma lenta y utilizando, como para la inyección de FG y de TxBA, una microjeringa de Hamilton con aguja de 26S.

4. Grupos experimentales

4.1. Primer grupo experimental: Para valorar la eficacia del fluoro-gold como marcador fluorescente de la población de motoneuronas del núcleo del VI par, su utilización como trazador persistente y los efectos neurotóxicos que esta sustancia pudiera producir en las motoneuronas, utilizamos:

Un total de 57 ratas de edades comprendidas entre 3 y 18 semanas, a las que se inyectó FG en el músculo recto lateral del ojo izquierdo (Fig. 3) y que dividimos en 7 subgrupos según el tiempo que transcurrió entre la administración de FG y su sacrificio:

Subgrupo A: Constituido por 20 ratas que se sacrificaron a los 7 días de la inyección.

Subgrupo B: Constituido por 8 ratas que se sacrificaron a los 21 días de la inyección.

Subgrupo C: Constituido por 9 ratas que fueron sacrificadas a los 28 días de la inyección.

Subgrupo D: Constituido por 7 ratas que fueron sacrificadas a los 37 días de la inyección.

Subgrupo E: Constituido por 6 ratas que fueron sacrificadas a los 67 días de la inyección.

Subgrupo F: Constituido por 5 ratas que se sacrificaron a los 97 días de la inyección.

Subgrupo G: Constituido por 2 ratas a las que se inyectó FG y 60 días más tarde se realizó otra inyección de FG en el mismo músculo, sacrificándolas a los 7 días de la segunda inyección.

Los animales de los subgrupos B y C fueron inyectados en el músculo RL del ojo derecho, ya que el músculo RL izquierdo fué utilizado para estudiar los efectos de la DXR (ver más adelante, en el tercer grupo experimental).

En un animal del subgrupo E se inyectó también FG en el músculo RL derecho, una semana antes de su sacrificio, para obtener fotografías comparativas de ambos núcleos del VI par craneal (ver más adelante, en resultados).

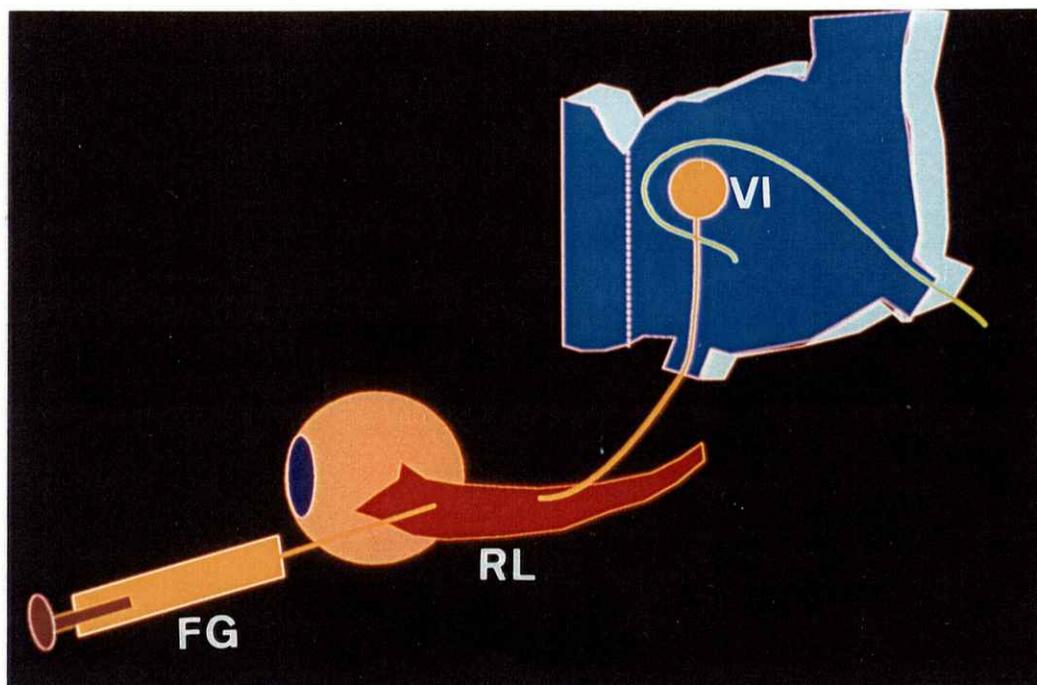


Fig. 3. Esquema que representa el método empleado para marcar con el trazador neuronal fluorescente fluoro-gold (FG) la población de motoneuronas del núcleo del VI par craneal de la ratona (VI). Tras acceder a la órbita por su vertiente superior externa, se aísla el músculo recto lateral (RL), en cuyo vientre se inyecta de forma lenta, el FG, que será transportado retrógradamente, desde los terminales nerviosos musculares hasta los somas neuronales, situados en el tronco del encéfalo.

4.2. Segundo grupo experimental: Para investigar los efectos a corto y largo plazo de la administración de distintas dosis de toxina botulínica tipo A (TxBA), en la supervivencia de las motoneuronas del núcleo del VI par craneal, en animales jóvenes, utilizamos:

Un total de 42 ratas postnatales (de 21 días de edad) con un peso que osciló entre 45 y 65 g, a las que se inyectó en el músculo recto lateral del ojo izquierdo distintas dosis, en Unidades (U), de TxBA (Allergan Botox^R, Allergan). Los animales los dividimos en 3 subgrupos según el tiempo de supervivencia y 7 días antes del sacrificio inyectamos FG en el músculo RL de ambos ojos, para identificar la población de motoneuronas (Fig. 4):

Subgrupo A: Constituido por 12 ratas que se sacrificaron a los 30 días de la administración de la TxBA. En este subgrupo se habían inyectado 0,125U en 4 animales, 1U en 4 animales y 2U en los 4 animales restantes.

Subgrupo B: Constituido por 12 ratas que fueron sacrificadas 60 días después de la administración de la TxBA, inyectando 0,125U en 5 animales, 0,250U en 4 animales y 1U en los 3 animales restantes.

Subgrupo C: Constituido por 18 ratas que se sacrificaron 90 días después de la inyección de la TxBA, administrando 0,125U en 5 animales, 0,250U en 5 animales, 1U en 5 animales y 2U en los 3 animales restantes.

Dada la dificultad para valorar en la rata de forma objetiva la existencia de endotropía o de ptosis tras la inyección de TxBA en el músculo RL, para comprobar la eficacia de la administración de la TxBA, en un grupo adicional de 5 animales de la misma edad, se inyectaron 2U de TxBA en el músculo masetero izquierdo, para observar sus efectos sobre la función de este músculo.

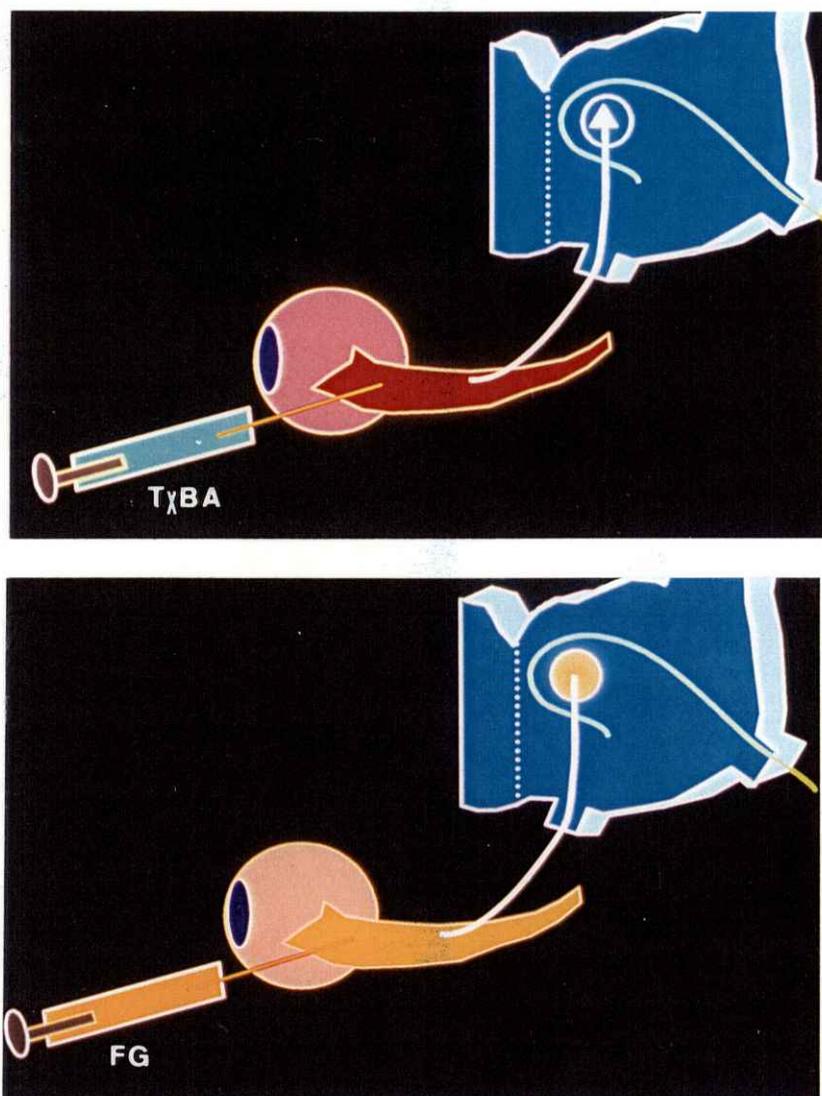


Fig. 4. Esquema que representa la secuencia de las inyecciones en los animales del segundo grupo experimental: a) Inyección de toxina botulínica tipo A (TxBA) en el músculo recto lateral izquierdo; b) Inyección de fluoro-gold (FG) en el músculo recto lateral de ambos ojos.

4.3. Tercer grupo experimental: Para cuantificar los efectos neurotóxicos de la doxorubicina (DXR) sobre la supervivencia de las motoneuronas del núcleo del VI par craneal, utilizamos:

Un total de 22 ratas de 100-150 g de peso corporal a las que se les inyectaron 5 microlitros de FG en el músculo RL de ambos ojos. Transcurridos 7 días de esta primera inyección, cuando todas las motoneuronas del núcleo del VI par han incorporado el trazador en su citoplasma, se administraron en el músculo RL

izquierdo diferentes dosis de Doxorubicina (DXR, Farmiblastina^R, Farmitalia Carlo Erba, Madrid) (Fig. 5).

Dividimos este grupo en 3 subgrupos según el tiempo de supervivencia tras la administración de DXR:

Subgrupo A: Constituido por 5 ratas que se sacrificaron 7 días después de inyectar DXR. A 2 animales se les inyectaron 200 microgramos de DXR en 5 microlitros y a los 3 animales restantes, 300 microgramos en 7,5 microlitros.

Subgrupo B: Constituido por 8 ratas que fueron sacrificadas 14 días después de la administración de DXR. A 2 animales se les inyectaron 100 microgramos de DXR en 2,5 microlitros, a 3 animales, 200 microgramos en 5 microlitros y a los 3 animales restantes 300 microgramos en 7,5 microlitros.

Subgrupo C: Constituido por 9 ratas que sacrificamos 21 días después de administrar la DXR. A 3 animales se les administraron 100 microgramos en 2,5 microlitros, a otros 3 animales, 200 microgramos en 5 microlitros y por último, a los 3 animales restantes, 300 microgramos en 7,5 microlitros.

En los animales de los subgrupos B y C, hemos utilizado el núcleo del VI par craneal derecho o control, para determinar el número de motoneuronas marcadas 21 y 28 días después de la aplicación de FG en el músculo RL. Estos resultados se han incorporado al primer grupo experimental (subgrupos B y C).

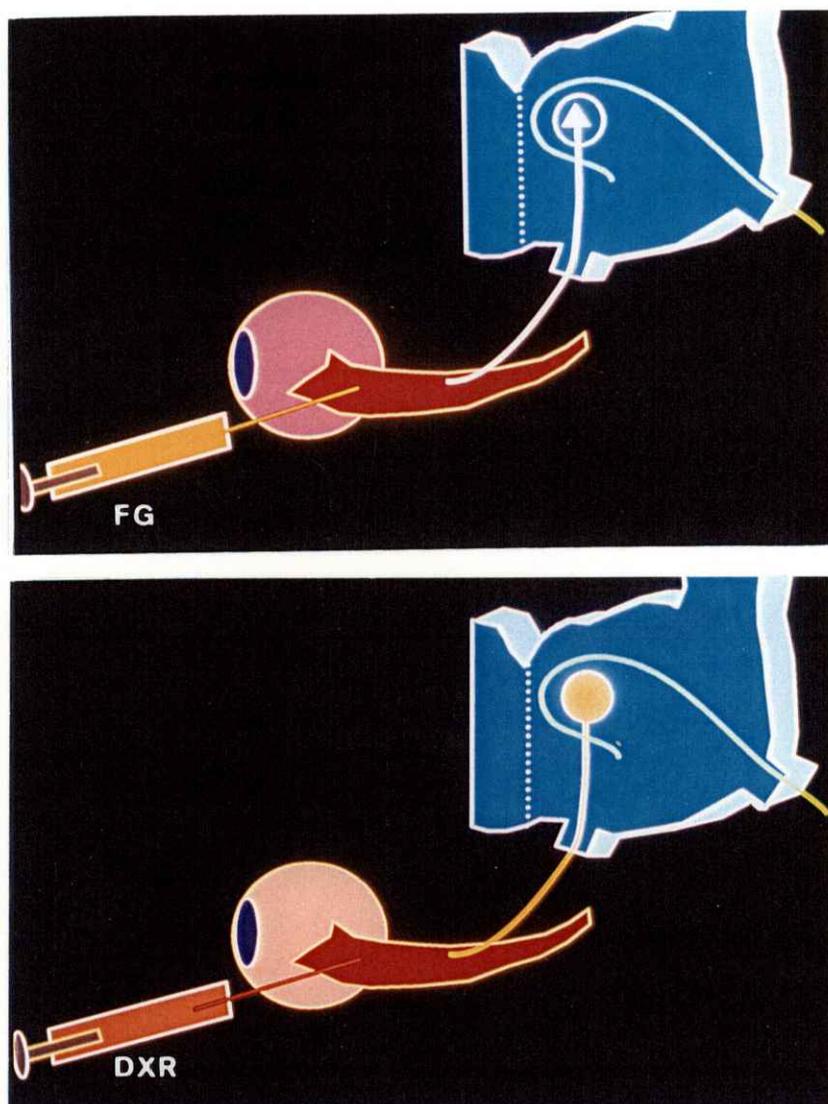


Fig. 5. Esquema que representa la secuencia de las inyecciones en los animales del tercer grupo experimental. a) Administración del fluoro-gold (FG) en el músculo recto lateral de ambos ojos; b) Administración de la doxorubicina (DXR) sólo en el músculo recto lateral izquierdo.

5. Proceso tisular

5.1. Manejo del tronco del encéfalo

Todos los animales fueron sacrificados con una sobredosis intraperitoneal de hidrato de cloral al 7%, y tras el clampaje de la aorta descendente a nivel supradiafragmático y la apertura de la aurícula derecha, se perfundían

transcardiacamente a través de la aorta ascendente, primero y por espacio de 2-3 minutos con 50 ml de una solución salina (ClNa al 0,9%) pasada rápidamente, y posteriormente con 200 ml de una solución fijadora que contenía paraformaldehído al 4% en tampón fosfato 0,1 Molar a temperatura ambiente.

El troncoencéfalo se disecó bajo control microscópico, y se postfijó durante dos horas en la misma solución fijadora. Posteriormente el troncoencéfalo se crioprotegió mediante su inmersión en una solución de sucrosa al 30% en tampón fosfato salino 0,1M (PBS), donde permanecía hasta que se hundía completamente (24-36 horas).

A continuación procedíamos al aislamiento y a la congelación de la zona del troncoencéfalo que contiene el núcleo del VI par craneal. La congelación se realizó sumergiendo el troncoencéfalo en una solución de 2-metil butano (Fluka) enfriado a la temperatura del nitrógeno líquido (-70° centígrados). Una vez congelada, orientábamos la pieza y hacíamos un bloque cubriéndola con "Freezing agent" (Microm Laborgeräte GmbH), bloque, que una vez atemperado (a -22° C aproximadamente), procedíamos a cortar en el criostato (JUNG CM3000, Leica). Obtuvimos cortes coronales seriados de 30 micras de grosor que se iban ordenando secuencialmente en portaobjetos gelatinizados. Los portas con los cortes de tejido, eran sometidos a tres lavados de cinco minutos de duración cada uno, en tampón fosfato salino 0,1M (PBS) y posteriormente eran secados al aire. Finalmente, las secciones se cubrían con una solución 3/1 (glicerol / tampón carbonato sódico 0,1M, pH, 9, conteniendo 0,04% de p-fenilendiamina "Sigma") para evitar la pérdida de fluorescencia y colocábamos un cubreobjetos que se sellaba pintándolo en todo su perímetro con laca de uñas.

5.2. Examen y documentación de las secciones histológicas

Las preparaciones que contenían el núcleo del VI par se examinaron en el microscopio de fluorescencia (Axiophot, Zeiss), utilizando el filtro ultravioleta que permite la visualización de la fluorescencia del FG (excitación BP 365/11, supresión LP 397). Fotografiamos, con película Kodak T-MAX 400, todas aquellas áreas de las secciones que mostraban neuronas marcadas con FG. Una vez revelados los carretes, procedíamos, a partir de los negativos y ayudados por una cámara de foto-vídeo (PVH-A7E, Sony) y una pantalla (Trinitron, Sony), a imprimir en una vídeo-impresora (UP-811, Sony) utilizando papel térmico (UPP-110S, Sony Type I), los negativos de las distintas secciones que constituían el núcleo, procediendo posteriormente al conteo de las motoneuronas.

En las preparaciones de los grupos experimentales segundo y tercero fotografiamos cada núcleo del VI par craneal por separado, primero el izquierdo, donde habíamos inyectado la TxBA o la DXR, según se tratara del segundo o tercer grupo de animales respectivamente, y posteriormente el núcleo derecho (núcleo control), que se correspondía con el músculo RL derecho donde sólo se había inyectado el FG en todos los casos.

Las fotografías de los núcleos del VI par craneal, donde contábamos los somas neuronales marcados con FG, fueron realizadas siempre a 31,25 aumentos (x1,25, aumento del optovar elegido; x10, aumento del objetivo; x 2,5 aumento estándar del microscopio).

Las secciones del troncoencéfalo que contenían el núcleo del VI par craneal de un animal del subgrupo C del tercer grupo experimental (procesado 21 días después de inyectar 200 microgramos de DXR en el músculo RL izquierdo y 28 días tras la administración de FG en el RL de ambos ojos), antes de ser montadas se tiñeron con yoduro de propidio (Sigma), fotografiando ambos núcleos ese mismo día

(por la pérdida precoz de la tinción con ioduro de propidio), tanto con el filtro ultravioleta que permite la visualización de la fluorescencia del FG, como con el filtro que permite la visualización del ioduro de propidio y además, con la técnica de doble exposición, que permite fotografiar la fluorescencia de ambos en una misma imagen.

5.3. Contaje de motoneuronas

En las motoneuronas del núcleo del VI par marcadas con FG, al igual que ocurre en las marcadas con peroxidasa de rábano (HRP), el nucléolo no es visible, por lo que no puede ser tomado como unidad de contaje (Labandeira-García y cols., 1983). En nuestro trabajo el contaje celular se efectuó empleando como unidad el soma neuronal, excluyendo las dendritas que muy frecuentemente aparecen en más de una sección. Debido al grosor de las secciones (30 micras), y al tamaño del soma de estas motoneuronas, éste se encontraba frecuentemente dividido entre dos de ellas, por lo que para determinar el número real de motoneuronas del núcleo del VI par craneal (N real), una vez que habíamos contado el número de somas en todas las secciones (N), era necesario multiplicarlo por el factor de corrección para células divididas de Konigsmark (F, Konigsmark, 1970): $N \text{ real} = N \times F$.

La fórmula para calcular F (Factor de corrección de Konigsmark para células divididas) es:

$$F = \frac{t}{t + 2\sqrt{r^2 - (k/2)^2}}$$

donde t = grosor de la sección histológica (30 micras); r = valor medio del radio del soma celular y k = diámetro mínimo celular, por debajo del cual el soma no se mide. En nuestro caso, el valor calculado de F para neuronas marcadas con FG y secciones histológicas de 30 micras fué de 0,59. Para obtener este factor,

determinamos el radio medio y el diámetro mínimo en 8 animales de distintas edades (30 días, n=2; 45 días, n=2; 90 días, n=2; y 120 días, n=2) correspondientes al primer grupo experimental. Para ello, sobre la imagen proyectada y ampliada de los negativos obtenidos tras fotografiar los núcleos del VI par craneal de estos animales, dibujamos los contornos de todos los somas celulares que constituían cada núcleo, con el ratón de un ordenador, y posteriormente con la ayuda de un Analizador de Imágenes MIP-Microm (Microm, Spain) obtuvimos el radio medio y el diámetro mínimo de los citoplasmas de las motoneuronas marcadas con FG.

6. Análisis estadístico

El estudio estadístico de los datos obtenidos, se efectuó utilizando los tests no paramétricos de Kruskal Wallis y de Mann-Whitney. Las diferencias fueron consideradas estadísticamente significativas cuando $p < 0,05$.

IV. RESULTADOS

RESULTADOS

1. Factor de Konigsmark

Para conseguir los objetivos que nos habíamos marcado en este estudio, era preciso en primer lugar determinar el factor de corrección de Konigsmark para las motoneuronas marcadas con FG. El uso de este factor nos permitiría obtener el número real de motoneuronas de cada núcleo del VI par craneal analizado.

En la tabla I recogemos las edades de los animales del primer grupo experimental empleados para hallar el factor de Konigsmark, así como el radio medio y el diámetro mínimo de los somas neuronales del núcleo del VI par craneal obtenidos en dichos animales.

Edad (días)	Radio medio (r)	Diámetro mínimo (k)	Factor de Konigsmark (F)
30	10,38	7,29	0,6
30	10,84	5,15	0,59
45	11,63	10,93	0,59
45	12,57	13,64	0,59
90	13,12	12,45	0,56
90	12,82	14,27	0,58
120	13,11	16,16	0,59
120	12,49	14,11	0,59
Media±ESM	12,12±0,37	11,75±1,33	0,59

Tabla I. Edad de los animales, radio medio y diámetro mínimo de las neuronas marcadas, utilizados para la obtención del factor de Konigsmark. (ESM, error estándar de la media).

En nuestro caso, el valor calculado del factor de Konigsmark para neuronas marcadas con FG, y secciones histológicas de 30 micras de grosor, varió de 0,56 a 0,60 y tuvo un valor medio de 0,59.

2. Primer grupo experimental: Eficacia del fluoro-gold como marcador retrógrado de la población de motoneuronas del núcleo del VI par craneal.

Para marcar selectivamente las motoneuronas del núcleo del VI par craneal y distinguirlas de las interneuronas de dicho núcleo, así como de otras células neuronales o no neuronales próximas del troncoencéfalo, utilizamos el trazador neuronal fluoro-gold, que inyectamos en el músculo recto lateral o externo de la rata.

2.1. Número de motoneuronas del núcleo del VI par craneal obtenido siete días tras la aplicación del fluoro-gold.

El examen a microscopía de fluorescencia de las secciones histológicas que contenían los núcleos del VI par craneal de los animales del subgrupo A del primer grupo experimental, es decir, aquellos que eran sacrificados 7 días después de inyectar FG en el músculo RL, permitía observar las neuronas marcadas. Estas células marcadas aparecían aproximadamente en 17-24 secciones consecutivas del troncoencéfalo (Fig. 6). Estas motoneuronas se podían identificar por la fluorescencia típica del FG en el citoplasma celular y los segmentos iniciales de las dendritas primarias, y se situaban en la protuberancia dorsal, próximas a la línea media y al suelo del IV ventrículo, entre la rodilla del nervio facial y el fascículo longitudinal medial (Fig. 7).

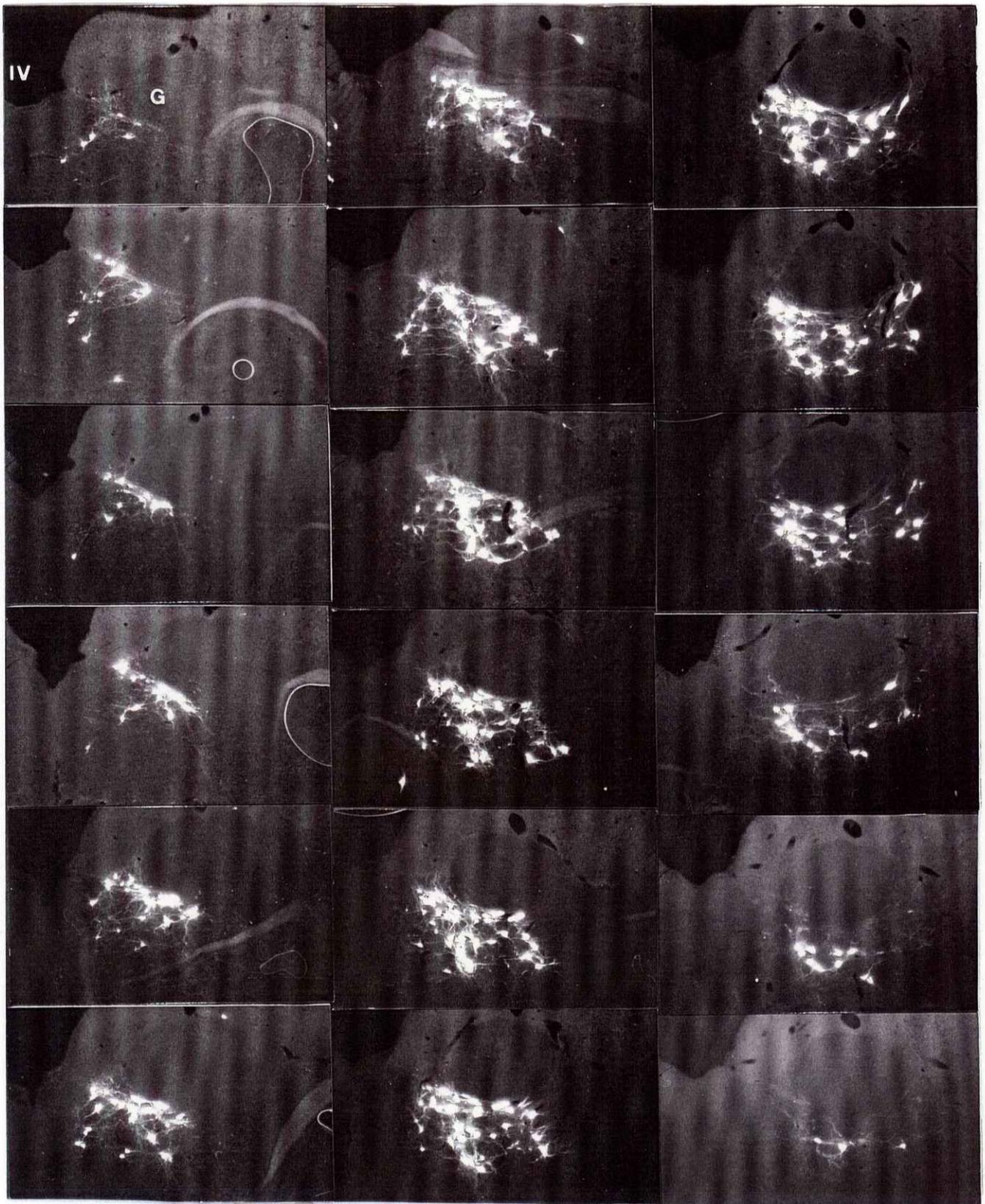


Fig. 6. Microfotografías seriadas (x40) de las secciones coronales del troncoencéfalo de una rata, 7 días después de inyectar fluoro-gold en el músculo recto lateral izquierdo, en las que se pueden observar las neuronas del núcleo del VI par craneal izquierdo marcadas con el trazador. Estas secciones aparecen ordenadas de arriba abajo y de izquierda a derecha. (IV, cuarto ventrículo; G, rodilla del facial).

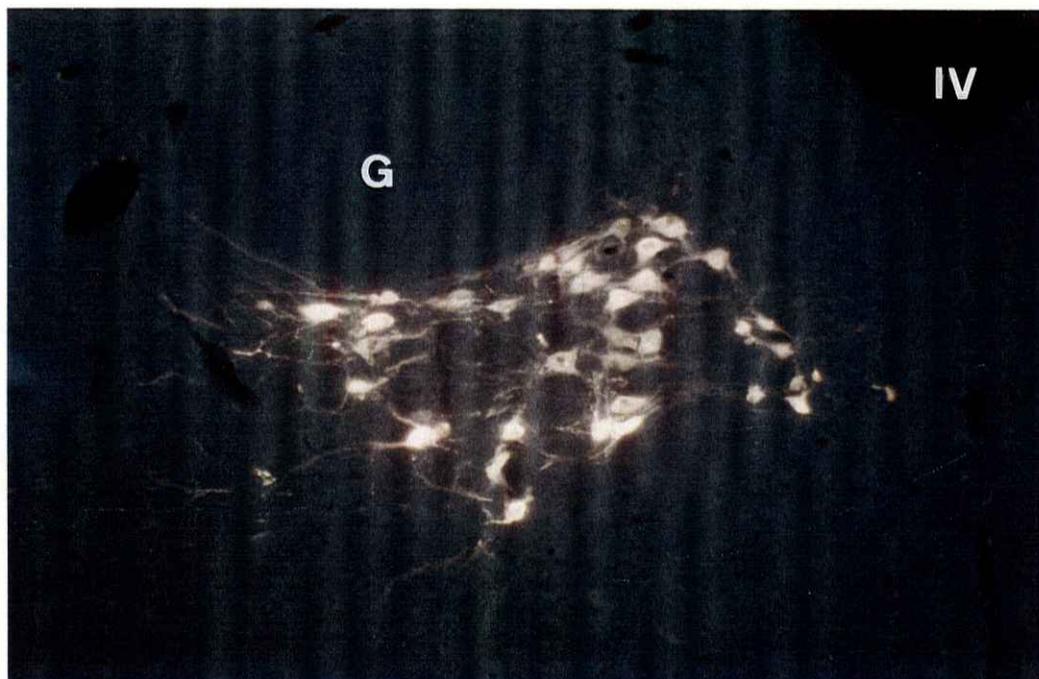


Fig. 7. Microfotografía de una sección coronal del núcleo del VI par craneal derecho de un animal experimental (x93), donde se observa la fluorescencia típica del fluoro-gold en el citoplasma y dendritas primarias de las motoneuronas 7 días después de inyectar el trazador en el recto lateral. (IV, cuarto ventrículo; G, rodilla del facial).

El número de motoneuronas de cada núcleo fué calculado contando los somas neuronales de todas las secciones donde aparecían citoplasmas marcados con FG, y multiplicando este número por el factor de corrección para células divididas de Konigsmark, que como anteriormente documentamos se estimó en 0,59.

El número medio de motoneuronas que obtuvimos en el núcleo del VI par craneal en el subgrupo A de animales (n= 20), fué de 271 ± 5 (Media \pm ESM), (Tabla II).

En la mayoría de los animales de este subgrupo y de todos los demás grupos que se analizaron posteriormente, observamos también de 3-5 motoneuronas marcadas en el núcleo accesorio del VI par craneal ipsilateral.

2.2. Utilidad del fluoro-gold como marcador persistente de las motoneuronas del núcleo del VI par craneal.

Una vez confirmada la eficacia del FG para marcar las motoneuronas que constituyen la población del núcleo del VI par craneal, determinamos la persistencia de este trazador fluorescente en dichas neuronas, lo que nos permitiría valorar su utilidad para realizar estudios a corto, medio y largo plazo, de la supervivencia de motoneuronas tras la inyección de sustancias neurotóxicas en el músculo RL del ojo.

Para conseguir este objetivo se analizaron dentro del primer grupo experimental los subgrupos B, C, D, E y F, en los que tras inyectar FG en el músculo RL de la rata, se sacrificaba al animal 21, 28, 37, 67 y 97 días después de dicha inyección respectivamente.

El examen a microscopía de fluorescencia de las secciones histológicas correspondientes a estos núcleos del VI par craneal, nos permitió observar, que a medida que se incrementaba el intervalo de supervivencia de los animales después de la aplicación del FG, disminuía la intensidad del marcaje, así como el número de células marcadas. No se visualizaron células gliales.

El número de motoneuronas del núcleo del VI par craneal contabilizado en dichos subgrupos, y reflejado en la tabla II, fué de: 267 ± 13 (n=8), 274 ± 8 (n=9), 251 ± 19 (n=7), 211 ± 5 (n=6) y 101 ± 7 (n=5) (Media \pm ESM), para los grupos de animales procesados a los 21, 28, 37, 67 y 97 días, respectivamente, después de la administración del FG en el músculo RL (Fig. 8).

Cuando comparamos estadísticamente el número medio de motoneuronas obtenido en estos subgrupos con respecto al número obtenido en el subgrupo A (animales procesados 7 días después de la inyección de FG en el músculo RL), no observamos diferencias estadísticamente significativas entre el subgrupo A y los subgrupos de animales procesados 21 (subgrupo B), 28 (subgrupo C) y 37 (subgrupo

D) días tras la inyección del FG. Sin embargo, sí observamos diferencias significativas entre los animales procesados 7 días tras la inyección de FG y los procesados 67 y 97 días tras la inyección del FG, ($p < 0,0005$ y $p < 0,0008$ respectivamente; test de Mann-Whitney).

	Tiempo transcurrido tras la inyección de FG (días)					
	7	21	28	37	67	97
	247	279	245	228	196	72
	252	238	280	275	211	113
	293	228	301	336	224	110
	214	330	237	273	206	106
	263	290	268	233	227	104
	270	221	293	174	201	
	263	270	297	235		
	280	278	259			
	285		287			
	263					
	266					
	283					
	314					
	274					
	309					
	283					
	293					
	251					
	268					
	258					
Media±ESM	271±5	267±13	274±8	251±19	211±5*	101±7*
%Supervivencia		99%	101%	93%	78%	37%
n	20	8	9	7	6	5

Tabla II. Número de motoneuronas marcadas con FG tras diversos períodos de supervivencia. (*) Diferencias estadísticamente significativas con respecto al período de supervivencia de 7 días. Test de Mann-Whitney ($p < 0,05$).

Para observar la diferencia del marcaje después de diversos períodos de supervivencia, en un mismo animal inyectamos FG el músculo RL del ojo izquierdo y 60 días más tarde administramos FG en el músculo RL derecho. Este animal fué procesado 7 días tras la segunda inyección, y en una sección coronal del troncoencéfalo del mismo, se puede observar claramente la diferencia tanto en intensidad de marcaje, como en el número de motoneuronas entre sus dos núcleos del VI par craneal, con relación al tiempo transcurrido (Fig. 9).

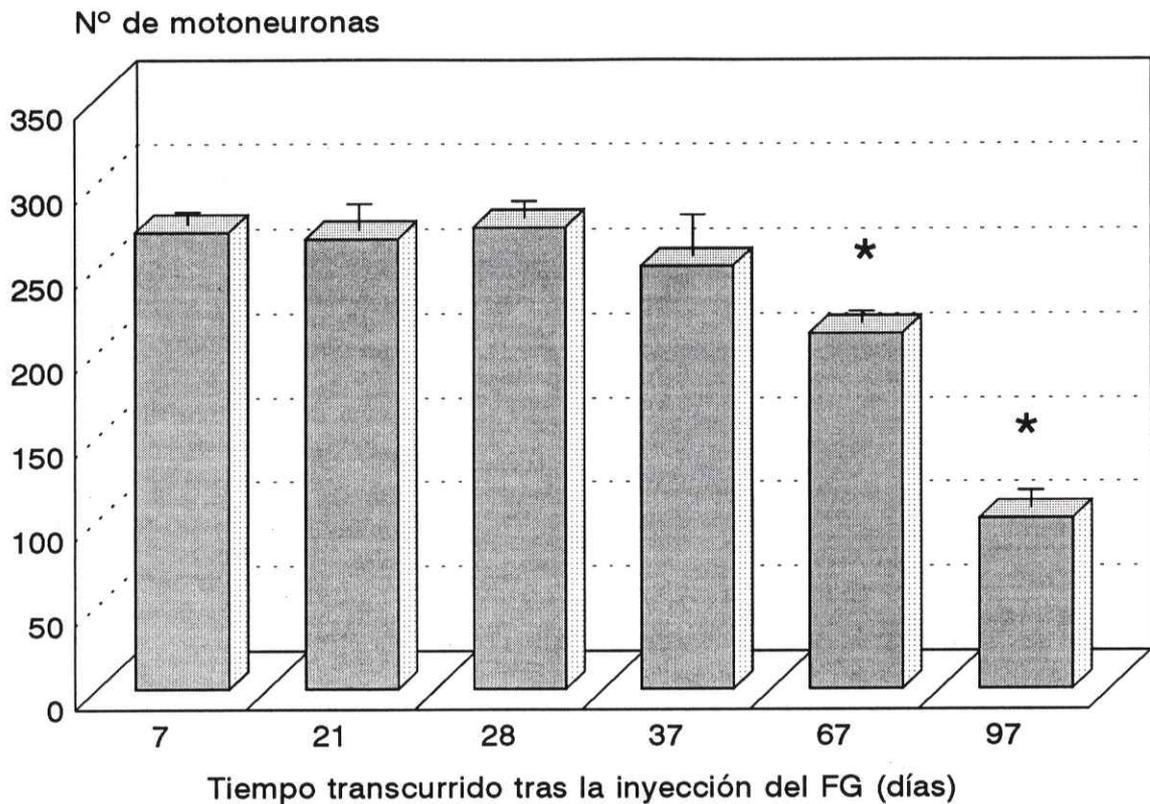


Fig. 8. Histograma que representa el número medio \pm ESM de células marcadas con fluoro-gold tras diversos períodos de supervivencia. (*) Diferencias estadísticamente significativas con respecto al período de supervivencia de 7 días. Test de Mann-Whitney ($p < 0,05$).

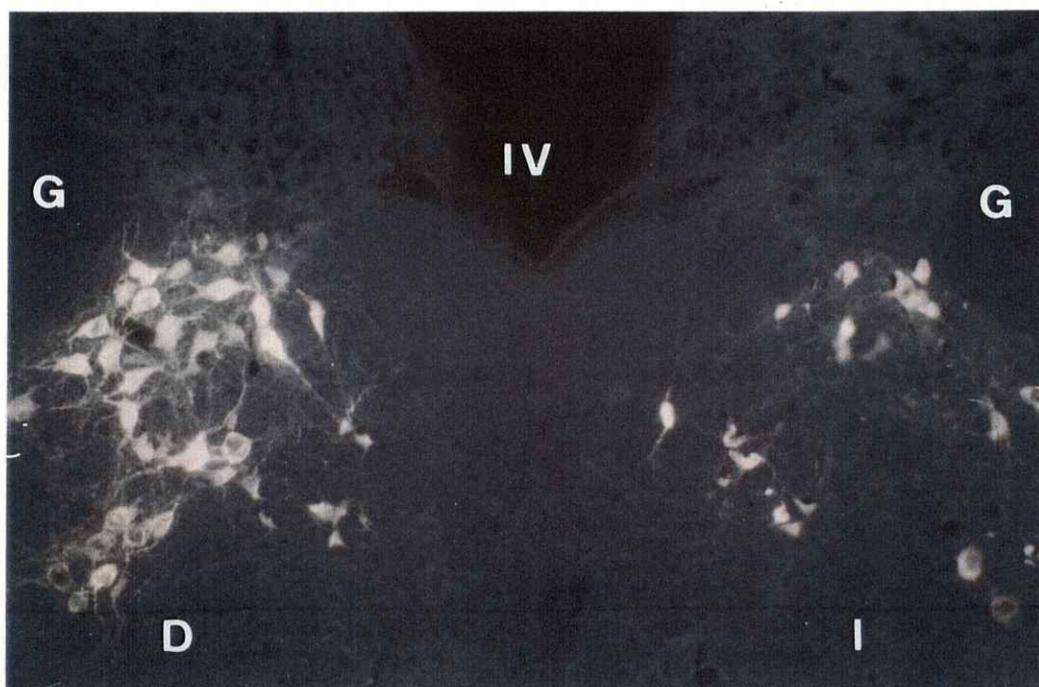


Fig. 9. Microfotografía de una sección coronal del troncoencéfalo a nivel de los núcleos del VI par craneal (x93), en la que se observa la diferencia tanto en intensidad de marcate como en el número de motoneuronas entre el núcleo izquierdo (I) y el derecho (D) marcados 67 y 7 días, respectivamente, antes de procesar el animal. (IV, cuarto ventrículo; G, rodilla del facial).

2.3. Posibles efectos sobre la supervivencia neuronal del marcate con fluoro-gold.

Para estudiar si la disminución del número de motoneuronas marcadas en el núcleo del VI par craneal podría deberse no a una pérdida del marcate, sino a un efecto tóxico del marcador, que produjera la muerte de estas células, a dos animales (subgrupo G del primer grupo experimental) se les inyectó FG en el músculo RL del ojo izquierdo y 60 días más tarde (período en el que hemos objetivado que disminuye el número de células marcadas con FG de forma estadísticamente significativa), se realizó de nuevo otra inyección de FG en el mismo músculo,

sacrificándolos a los 7 días de la segunda inyección. El número de motoneuronas de estos dos animales fué de 283 y 309. Estos números de motoneuronas se encuentran dentro del rango obtenido en el subgrupo A de animales, procesados 7 días tras la inyección del FG en el músculo RL. Así mismo no se observó ninguna alteración morfológica evidente de las neuronas marcadas (Fig.10).



Fig. 10. Microfotografía (x93) de una sección coronal del troncoencéfalo de un animal cuyo músculo recto lateral izquierdo fué reinyectado con fluoro-gold 60 días tras la primera inyección y que fué procesado 7 días más tarde. (IV, cuarto ventrículo; G, rodilla del facial).

3. Segundo grupo experimental: Efectos a corto y largo plazo de la administración de distintas dosis de toxina botulínica tipo A, en el músculo recto lateral.

En este grupo de animales queríamos valorar los efectos sobre la supervivencia de las motoneuronas del núcleo del VI par craneal, de la administración de TxBA en el músculo RL. Como los resultados del primer grupo experimental indicaban que el FG comenzaba a desaparecer de los somas neuronales 37 días después de su administración intramuscular, en este grupo experimental inyectamos primero la TxBA y posteriormente el FG, 7 días antes de procesarlos, ya que los tiempos de supervivencia en los animales de los subgrupos B y C sobrepasaban los tiempos de permanencia óptimos del FG en el soma de las motoneuronas.

La inyección de TxBA fué realizada en el músculo RL izquierdo, y la inyección de FG fué bilateral, para utilizar el marcaje del núcleo del VI par derecho como control.

El examen a microscopía de fluorescencia de las secciones histológicas del troncoencéfalo correspondientes a estos núcleos del VI par craneal, nos permitió observar que no existían diferencias evidentes ni en el número de motoneuronas ni en la intensidad de marcaje entre los núcleos izquierdo o experimental y derecho o control de un mismo animal. Así mismo, no se visualizaron células gliales marcadas.

A continuación contamos el número de citoplasmas marcados con FG en cada núcleo y hallamos el número final de motoneuronas aplicando el factor de corrección de Konigsmark ya estimado, tanto en el núcleo izquierdo o experimental, como en el derecho o control.

En los animales del subgrupo A, aquellos que eran sacrificados 30 días después de la administración de la TxBA, el número total de motoneuronas

marcadas fué de 294 ± 5 ($n=4$), 314 ± 10 ($n=4$) y 304 ± 11 ($n=4$) (Media \pm ESM) en el núcleo experimental izquierdo, correspondiente al músculo RL donde se habían inyectado 0,125U, 1U y 2U (Fig. 11) respectivamente de TxBA, frente a las 303 ± 6 ($n=4$), 311 ± 11 ($n=4$) y 301 ± 8 ($n=4$) que se contabilizaron respectivamente en el núcleo control derecho de estas ratas (Tabla III). Cuando comparamos el número medio de motoneuronas marcadas en el núcleo del VI par craneal experimental con el del núcleo control contralateral de cada animal de este grupo, no encontramos diferencias estadísticamente significativas (test de Mann-Whitney, $p > 0,05$).

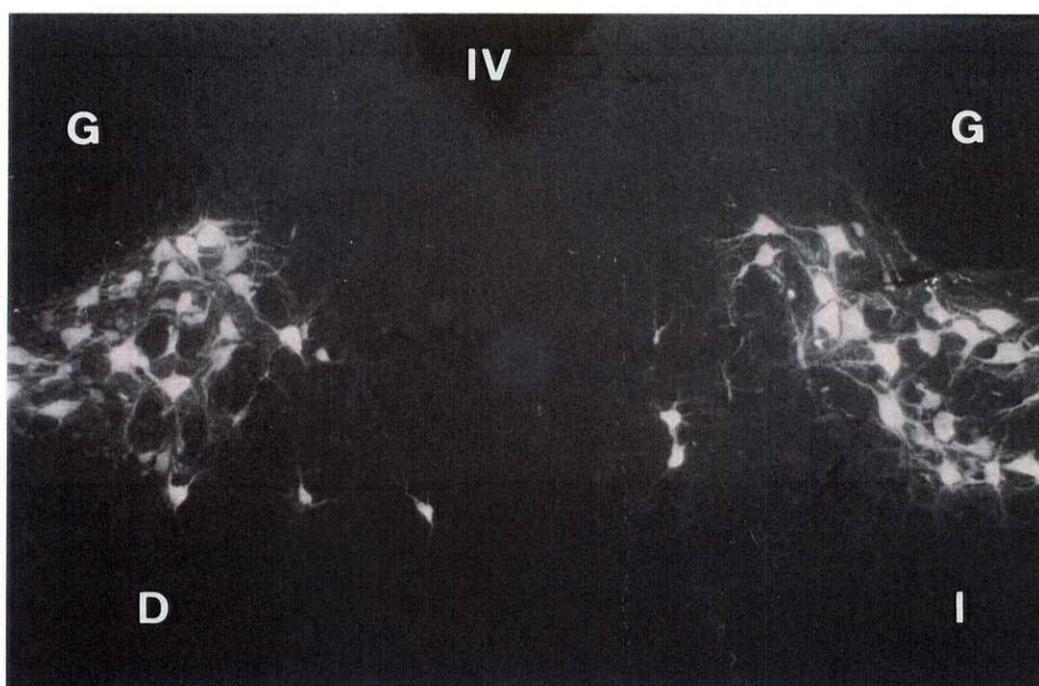


Fig. 11. Microfotografía de fluorescencia de una sección coronal del troncoencéfalo que incluye ambos núcleos del VI par craneal (x93), 30 días después de inyectar 2U de TxBA en el músculo recto lateral izquierdo y 7 días después de inyectar fluoro-gold en ambos músculos rectos laterales. Tanto el núcleo izquierdo (I) como el derecho (D) presentaban un número similar de motoneuronas. (IV, cuarto ventrículo; G, rodilla del facial).

Dosis TxBA	Núcleo Control	Núcleo Experimental
0,125 U	297	290
	302	291
	320	308
	293	287
Media±ESM	303±6	294±5
% Supervivencia		97%
n	4	4
1 U	285	289
	299	306
	327	330
	332	330
Media±ESM	311±11	314±10
% Supervivencia		101%
n	4	4
2 U	293	298
	292	290
	324	337
	296	289
Media±ESM	301±8	304±11
% Supervivencia		101%
n	4	4

Tabla III. Número de motoneuronas marcadas con FG en el núcleo del VI par craneal derecho (control) e izquierdo (experimental) de los animales procesados 30 días tras la inyección de TxBA, y porcentaje de supervivencia en el núcleo experimental respecto al control.

El número de motoneuronas del núcleo del VI par craneal izquierdo o experimental de los animales del subgrupo B, que fueron sacrificados 60 días después de la administración de 0,125U, 0,250U y 1U de TxBA en el músculo RL izquierdo, fué de 308 ± 9 (n=5), 331 ± 17 (n=4) y 303 ± 13 (n=3) (Media±ESM)

respectivamente, frente a las 311 ± 10 ($n=4$), 321 ± 10 ($n=4$) y 315 ± 18 ($n=3$) que se contabilizaron respectivamente en el núcleo control derecho de esas ratas (Tabla IV). No se observaron diferencias estadísticamente significativas (test de Mann-Whitney) entre el número medio de motoneuronas del núcleo experimental y el del núcleo control de cada animal.

Dosis TxBA	Núcleo Control	Núcleo Experimental
0,125 U	309	327
	309	304
	336	322
	288	277
	308	
Media±ESM	311±10	308±9
% Supervivencia		99%
n	4	5
0,250 U	339	355
	299	299
	338	365
	309	304
Media±ESM	321±10	331±17
% Supervivencia		103%
n	4	4
1 U	309	314
	348	317
	287	278
Media±ESM	315±18	303±13
% Supervivencia		96%
n	3	3

Tabla IV. Número de motoneuronas marcadas con FG en el núcleo del VI par craneal derecho (control) e izquierdo (experimental) de los animales procesados 60 días tras la inyección de TxBA, y porcentaje de supervivencia en el núcleo experimental respecto al control.

Cuando los animales se sacrificaron 90 días después (subgrupo C) de la administración de 0,125U, 0,250U, 1U y 2U (Fig. 12) de TxBA en el músculo RL izquierdo, el número de motoneuronas del núcleo del VI par craneal izquierdo o experimental fué de 309 ± 12 (n=5), 316 ± 21 (n=5), 339 ± 13 (n=5) y 307 ± 16 (n=3) (Media \pm ESM) respectivamente, frente a las 304 ± 11 (n=5), 315 ± 18 (n=4), 343 ± 16 (n=5) y 301 ± 16 (n=3) que se contabilizaron respectivamente en el núcleo control derecho de estas ratas (Tabla V). Las diferencias entre el número medio de motoneuronas obtenido en los dos núcleos, control y experimental, de cada animal de este grupo, no fueron estadísticamente significativas (test de Mann-Whitney).

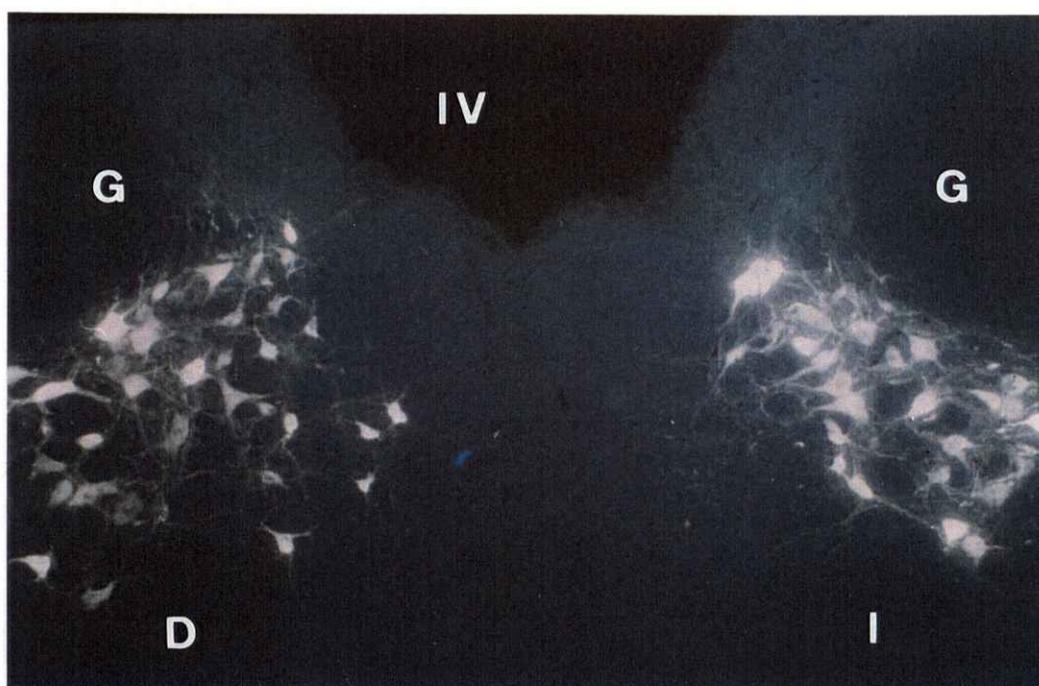


Fig. 12. Microfotografía de fluorescencia de una sección coronal del troncoencéfalo que incluye ambos núcleos del VI par craneal (x93), 90 días después de inyectar 2U de TxBA en el músculo recto lateral izquierdo y 7 días después de inyectar fluoro-gold en ambos músculos rectos laterales. Tanto el núcleo izquierdo (I) como el derecho (D) presentaban un número similar de motoneuronas. (IV, cuarto ventrículo; G, rodilla del facial).

Dosis TxBA	Núcleo Control	Núcleo Experimental
0,125 U	314	338
	303	309
	288	280
	340	331
	277	286
Media±ESM	304±11	309±12
% Supervivencia		102%
n	5	5
0,250 U	286	290
	356	360
	281	279
	335	373
		279
Media±ESM	315±18	316±21
% Supervivencia		100%
n	4	5
1 U	391	380
	350	337
	295	301
	349	341
	331	336
Media±ESM	343±16	339±13
% Supevivencia		99%
n	5	5
2 U	286	289
	333	339
	283	294
Media±ESM	301±16	307±16
% Supervivencia		102%
n	3	3

Tabla V. Número de motoneuronas marcadas con FG en el núcleo del VI par craneal derecho (control) e izquierdo (experimental) de los animales procesados 90 días tras la inyección de TxBA, y porcentaje de supervivencia en el núcleo experimental respecto al control.

Además, en cada subgrupo de animales y para cada una de las dosis de TxBA administradas, calculamos el porcentaje de supervivencia de la población de motoneuronas del núcleo del VI par craneal izquierdo, que podía haber experimentado cambios tras la administración de toxina en el músculo al que inerva, respecto a la del núcleo contralateral control (Tablas III, IV, V y VI).

Período de Supervivencia	Motoneuronas Supervivientes	Dosis de toxina botulínica tipo A			
		0,125 U	0,250 U	1 U	2 U
30 días	Media±ESM	294±5		314±10	304±11
	%	97%		101%	101%
	n	4		4	4
60 días	Media±ESM	308±9	331±17	303±13	
	%	99%	103%	96%	
	n	5	4	3	
90 días	Media±ESM	309±12	316±21	339±13	307±16
	%	102%	100%	99%	102%
	n	5	5	5	3

Tabla VI. Número de motoneuronas marcadas con FG en el núcleo del VI par craneal izquierdo tras la administración de TxBA. % de supervivencia respecto al núcleo control contralateral.

También, comparamos el número medio de neuronas marcadas entre todos los subgrupos experimentales, utilizando el test de Kruskal-Wallis, no observando diferencias estadísticamente significativas ($p>0.6$), lo que nos indica que tampoco el tiempo de supervivencia modificaba el número de células marcadas.

Cuando valoramos los efectos de la TxBA en los 5 animales adicionales de este grupo, a los que habíamos inyectado 2U de la misma en el músculo masetero izquierdo, observamos que a los 21 días de la inyección, su peso oscilaba entre 83 y 110 gramos, mientras que el del resto de ratas de la misma edad, en las que inyectamos la TxBA en el músculo RL izquierdo, oscilaba entre 135 y 155 gramos. Pensamos que el menor peso fue debido a la dificultad en la masticación por la parálisis flácida que se producía secundariamente a la inyección de la TxBA.

4. Tercer grupo experimental: Cuantificación de los efectos neurotóxicos de la administración intramuscular de doxorubicina sobre la supervivencia de las motoneuronas del núcleo del VI par craneal.

En este grupo de animales queríamos valorar los efectos sobre la supervivencia de las motoneuronas del núcleo del VI par craneal, de la administración de un conocido agente neurotóxico, la DXR, en el músculo RL, lo que nos proporcionaría un modelo experimental de muerte neuronal.

En este grupo experimental inyectamos primero el FG y posteriormente la DXR, sacrificando a los animales 7, 14 ó 21 días después de esta última inyección, de manera que el tiempo de supervivencia máximo tras la administración del FG fué de 28 días (subgrupo C), período por otra parte, compatible con los tiempos de permanencia óptimos del FG en el soma de las motoneuronas, como documentamos anteriormente.

La inyección de DXR fué realizada en el músculo RL izquierdo, y la inyección previa (7 días antes) de FG fué bilateral, para utilizar el marcaje del núcleo del VI par derecho como control.

El examen a microscopía de fluorescencia de las secciones histológicas permitió observar, que las motoneuronas del núcleo del VI par craneal presentaban en los somas y dendritas primarias la fluorescencia característica del FG, y que en los núcleos correspondientes al músculo RL izquierdo de todos los subgrupos, además de una disminución en el número de motoneuronas, se apreciaron otras células intensamente marcadas con FG que tenían un soma pequeño e irregular del que emanaban procesos finos y tortuosos. Esas células, que se diferenciaban morfológicamente de las motoneuronas, presentaban el típico aspecto de la microglía (Figs. 13-16).

El número de motoneuronas de cada núcleo fue calculado por contaje de los somas neuronales en todas las secciones donde aparecían citoplasmas marcados con FG, usando el factor de corrección para células divididas de Königsmark, que como anteriormente documentamos, se estimó en 0,59.

Comparando el número medio de motoneuronas marcadas en el núcleo del VI par craneal izquierdo con las del núcleo control contralateral de cada animal, hallamos el porcentaje de supervivencia de la población de motoneuronas del núcleo del VI par craneal tras la administración de DXR .

En los animales del subgrupo A, aquellos que eran sacrificados 7 días después de la administración de 200 ó 300 microgramos de DXR en el músculo RL izquierdo, el número total de motoneuronas marcadas en el núcleo del VI par craneal izquierdo o experimental fue de 216 ± 6 ($n=2$) y 206 ± 8 ($n=3$) (Media \pm ESM) respectivamente, que se corresponde a un 80% y un 77% con respecto al número de motoneuronas de los núcleos controles derechos (Tablas VII y X).

Dosis DXR	Núcleo Control	Núcleo Experimental
200 μg	209	210
	329	222
Media \pm ESM	269\pm60	216\pm6
% Supervivencia		80%
n	2	2
300 μg	251	222
	286	201
	263	195
Media \pm ESM	267\pm10	206\pm8
% Supervivencia		77%
n	3	3

Tabla VII. Supervivencia de las motoneuronas del núcleo del VI par craneal 7 días después de la administración de DXR en el músculo recto lateral izquierdo.

El número de motoneuronas del núcleo del VI par craneal izquierdo o experimental de los animales que fueron sacrificados 14 días después de la administración de 100, 200 (Fig. 13) ó 300 microgramos de DXR en el músculo RL izquierdo, fué de 90 ± 4 ($n=2$), 66 ± 4 ($n=3$), 47 ± 11 ($n=3$) (Media \pm ESM) respectivamente, que se corresponde a un 35%, un 23% y un 18% con respecto al número de motoneuronas de los núcleos controles derechos (Tablas VIII y X).



Fig. 13. Microfotografía de una sección coronal del troncoencéfalo que incluye ambos núcleos del VI par craneal (x93), 21 días después de aplicar fluoro-gold en ambos músculos rectos laterales y, 14 días después de inyectar $200 \mu\text{g}$ de DXR en el músculo recto lateral izquierdo. El núcleo derecho (D) presenta un aspecto normal. Sin embargo, en el núcleo izquierdo (I), se observan menos motoneuronas marcadas con fluoro-gold y células de la microglía (flecha) intensamente marcadas. (IV, cuarto ventrículo; G, rodilla del facial).

Dosis DXR	Núcleo Control	Núcleo Experimental
100 µg	279	86
	238	94
Media±ESM	259±21	90±4
% Supervivencia		35%
n	2	2
200 µg	228	60
	330	74
	290	64
Media±ESM	249±20	66±4
% Supervivencia		23%
n	3	3
300 µg	221	52
	270	64
	278	25
Media±ESM	256±18	47±11
% Supervivencia		18%
n	3	3

Tabla VIII. Supervivencia de las motoneuronas del núcleo del VI par craneal 14 días después de la administración de DXR en el músculo recto lateral izquierdo.

Cuando los animales se sacrificaron 21 días después (subgrupo C) de la administración de 100 (Fig. 14), 200 ó 300 (Figs. 15 y 16) microgramos de DXR en el músculo RL izquierdo, el número de motoneuronas del núcleo del VI par craneal izquierdo o experimental fué de 109 ± 24 ($n=3$), 58 ± 12 ($n=3$), 53 ± 6 ($n=3$) (Media \pm ESM) respectivamente, que se corresponde a un 40%, un 22% y a un 16% con respecto al número de motoneuronas de los núcleos controles derechos (Tablas IX y X).

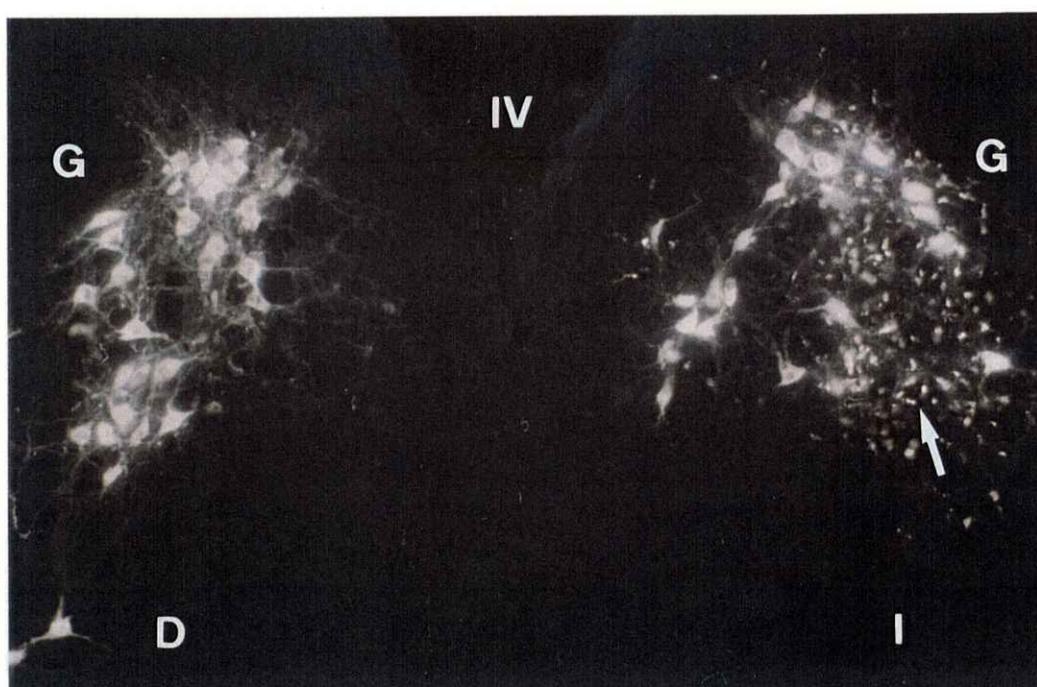


Fig. 14. Microfotografía de una sección coronal del troncoencéfalo que incluye ambos núcleos del VI par craneal ($\times 93$), 28 días después de aplicar fluoro-gold en ambos músculos rectos laterales y, 21 días después de inyectar $100 \mu\text{g}$ de DXR en el músculo recto lateral izquierdo. En el núcleo izquierdo (I), se observan menos motoneuronas marcadas con fluoro-gold y células de la microglía (flecha) intensamente marcadas. El núcleo derecho (D) tiene un aspecto normal. (IV, cuarto ventrículo; G, rodilla del facial).

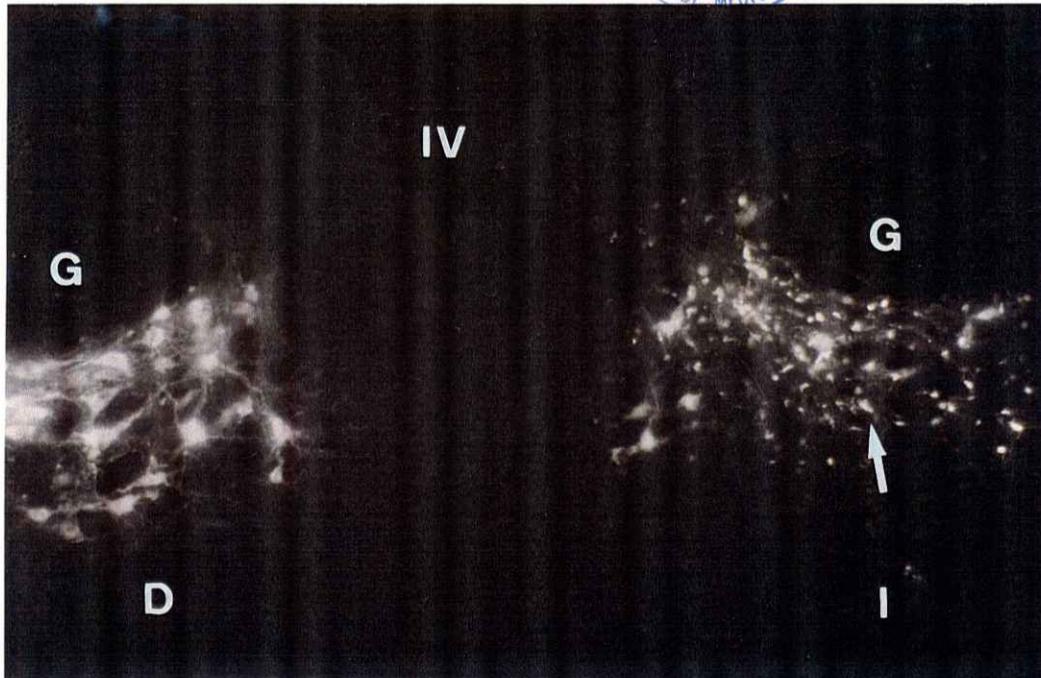


Fig. 15. Microfotografía de una sección coronal del troncoencéfalo que incluye ambos núcleos del VI par craneal (x93), 28 días después de aplicar fluoro-gold en ambos músculos rectos laterales y, 21 días después de inyectar 300 mg de DXR en el músculo RL izquierdo. En el núcleo izquierdo (I), se aprecian menos motoneuronas marcadas con fluoro-gold y células de la microglía (flecha) intensamente marcadas. El núcleo derecho (D) tiene un aspecto normal. (IV, cuarto ventrículo; G, rodilla del facial).

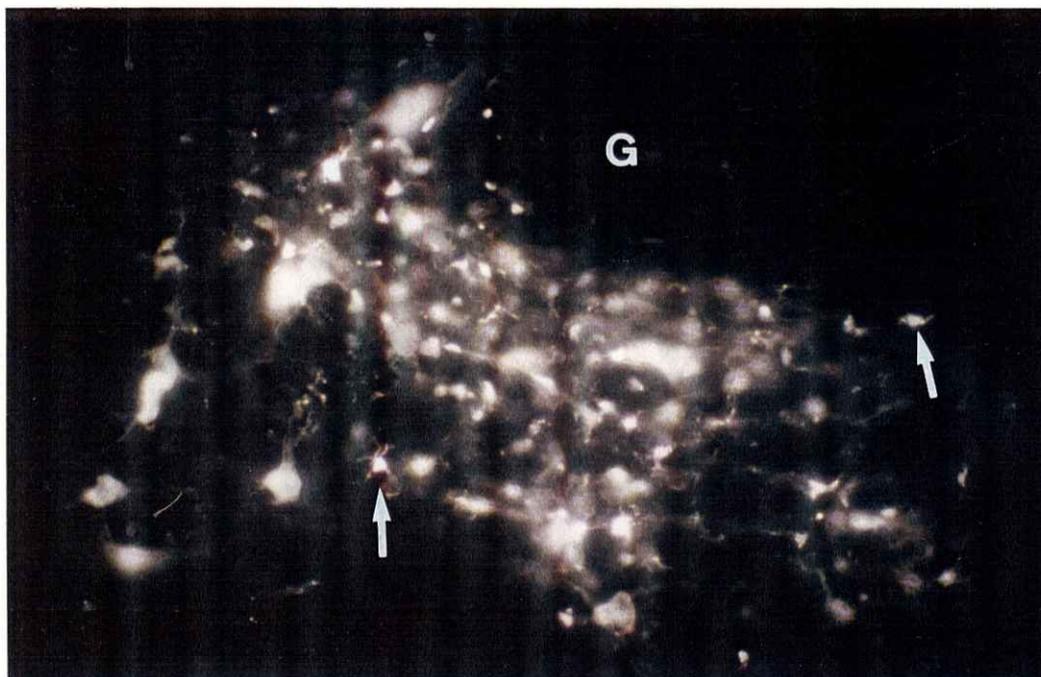


Fig. 16. Microfotografía (x185) en la que se pueden observar a mayor aumento muchas células de la microglía intensamente marcadas con fluoro-gold (flechas), en otra sección del troncoencéfalo del mismo animal de la figura anterior. (G, rodilla del facial).

Dosis DXR	Núcleo Control	Núcleo Experimental
100 µg	245	65
	280	149
	301	114
Media±ESM	275±16	109±24
% Supervivencia		40%
n	3	3
200 µg	237	66
	268	74
	293	34
Media±ESM	266±16	58±12
% Supervivencia		22%
n	3	3
300 µg	297	61
	259	57
	287	41
Media±ESM	281±11	53±6
% Supervivencia		16%
n	3	3

Tabla IX. Supervivencia de las motoneuronas del núcleo del VI par craneal 21 días después de la administración de DXR en el músculo recto lateral izquierdo.

El número de motoneuronas de los núcleos del VI par craneal de los animales procesados 7 días después de la administración de DXR, fué discretamente inferior al obtenido en los núcleos contralaterales. Sin embargo, a los 14 días (subgrupo B) de la administración de la DXR, el porcentaje de supervivencia de las motoneuronas del núcleo del VI par craneal izquierdo disminuyó ostensiblemente, lo que sugiere que entre la primera y la segunda semana se produce la muerte de gran parte de la

población de motoneuronas que inervan al músculo RL izquierdo. Esta disminución del porcentaje de supervivencia se mantuvo en los animales que fueron sacrificados 21 días tras la inyección de DXR (subgrupo C), sugiriendo que este proceso de muerte neuronal se produce principalmente entre la primera y la segunda semana después de la administración de la DXR (Tabla X, Fig. 17).

Por otra parte, dentro de cada uno de estos subgrupos de animales, observamos un menor porcentaje de supervivencia conforme aumenta la dosis de DXR administrada, lo que sugiere que este efecto neurotóxico es dosis-dependiente (Tabla X, Fig. 17).

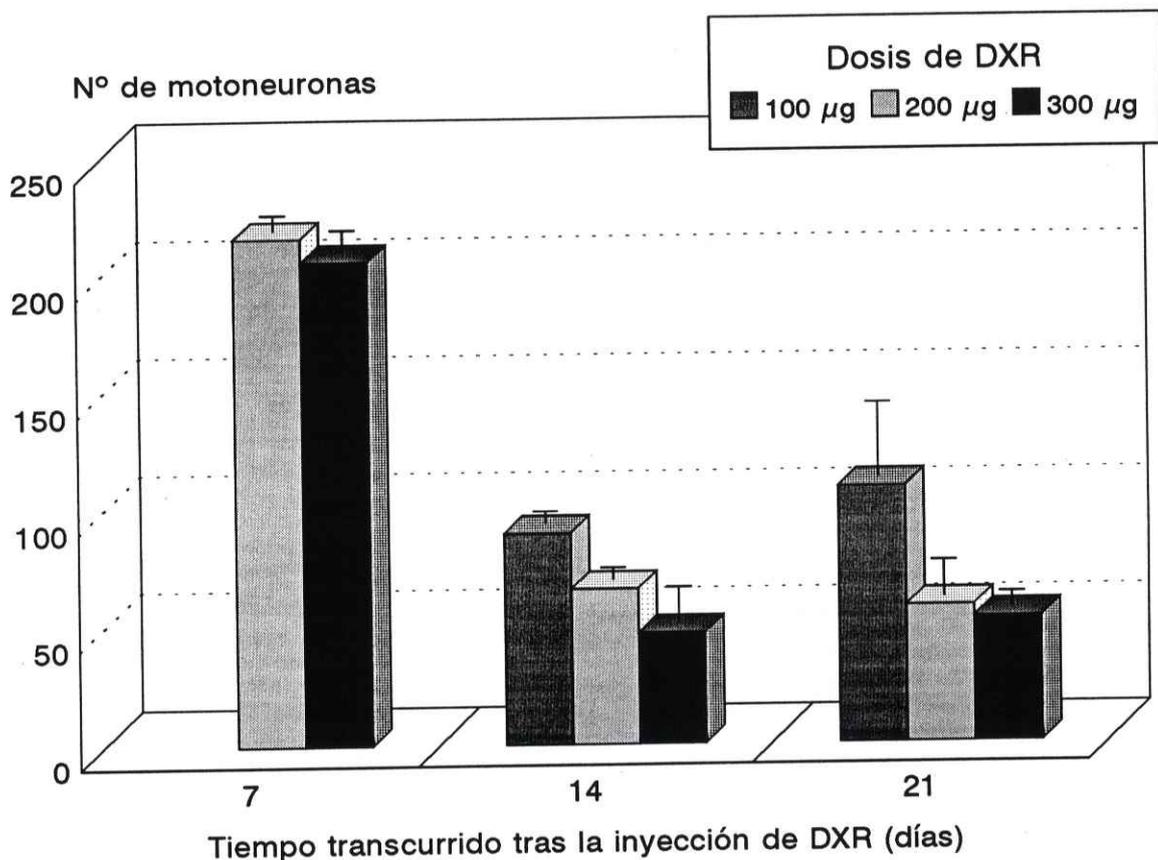


Fig. 17. Histograma que representa el número medio \pm ESM de células marcadas con fluoro-gold después de varios períodos de tiempo tras la administración de diferentes dosis de DXR en el músculo recto lateral izquierdo.

Período de Supervivencia	Motoneuronas Supervivientes	Dosis de Doxorrubicina		
		100 µg	200 µg	300 µg
7 días	Media±ESM		216±6	206±8
	%		80%	77%
	n		2	3
14 días	Media±ESM	90±4	66±4	47±11
	%	35%	23%	18%
	n	2	3	3
21 días	Media±ESM	109±24	58±12	53±6
	%	40%	22%	16%
	n	3	3	3

Tabla X. Supervivencia de las motoneuronas del núcleo del VI par craneal tras la administración de DXR en el músculo recto lateral izquierdo.

Las secciones del troncoencéfalo que contenían el núcleo del VI par craneal de un animal del subgrupo C (procesado 21 días después de inyectar 200 microgramos de DXR en el músculo RL izquierdo), antes de ser montadas se tiñeron con yoduro de propidio con el fin de confirmar que la disminución del número de motoneuronas del núcleo del VI par craneal izquierdo, se debía a la muerte neuronal secundaria a la administración de la DXR, y no a una pérdida de la fluorescencia neuronal. En la figura 18, observamos una microfotografía panorámica realizada con la técnica de doble exposición, de una sección del troncoencéfalo de este animal que incluye ambos núcleos (derecho e izquierdo) del VI par craneal marcados con FG e yoduro de propidio. En el núcleo izquierdo observamos menor número de motoneuronas marcadas que en el núcleo derecho, así como la presencia de células gliales. En la figura 19 podemos observar 3 fotografías a mayor aumento de cada uno de esos núcleos, realizadas una con la técnica de doble exposición y las otras con dos filtros diferentes, uno que nos permite la visualización del FG y el otro la del yoduro de propidio. En ellas podemos confirmar la diferencia en el número de motoneuronas entre ambos núcleos y, que en el núcleo izquierdo se observa tanto un

menor número de motoneuronas marcadas con FG, como un menor número de células grandes (presumiblemente, motoneuronas) teñidas con yoduro de propidio, lo que indica que parte de las motoneuronas han muerto, como consecuencia de la administración de DXR.

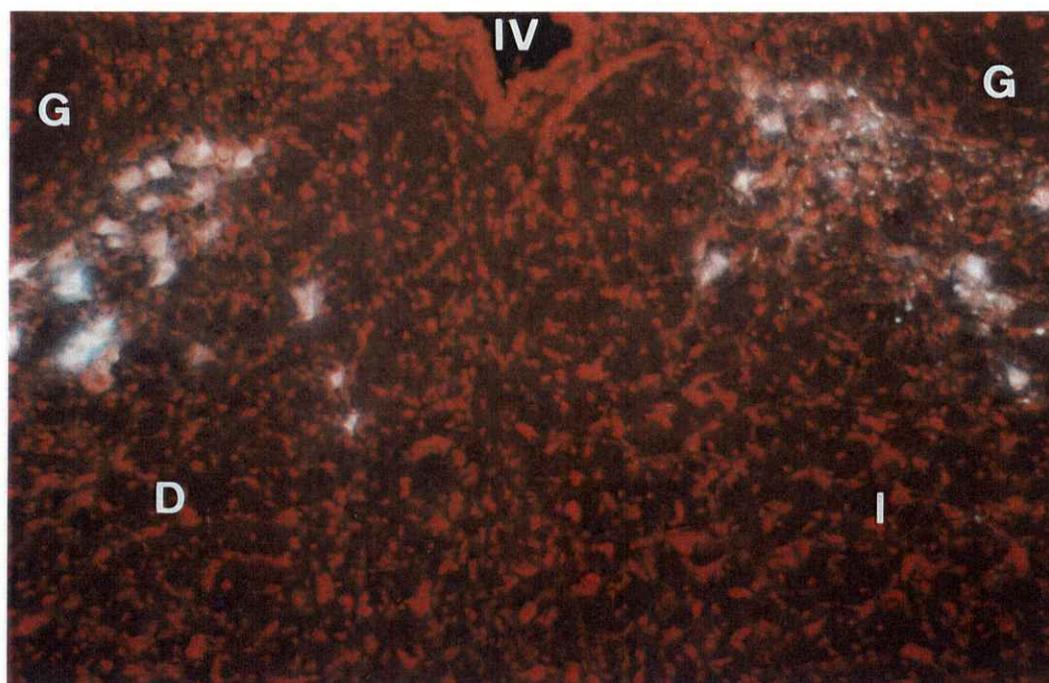


Fig. 18. Microfotografía tomada al microscopio de fluorescencia con la técnica de doble exposición, de una sección coronal del troncoencefalo (x93) teñida con yoduro de propidio, que incluye ambos núcleos del VI par craneal de un animal procesado 28 días después de inyectar fluoro-gold en ambos músculos rectos laterales, y 21 días después de inyectar 200 μg de DXR en el músculo recto lateral izquierdo. En el núcleo izquierdo (I) se observa un menor número de motoneuronas marcadas que en el núcleo derecho (D), así como la presencia de células gliales. (IV, cuarto ventrículo; G, rodilla del facial).

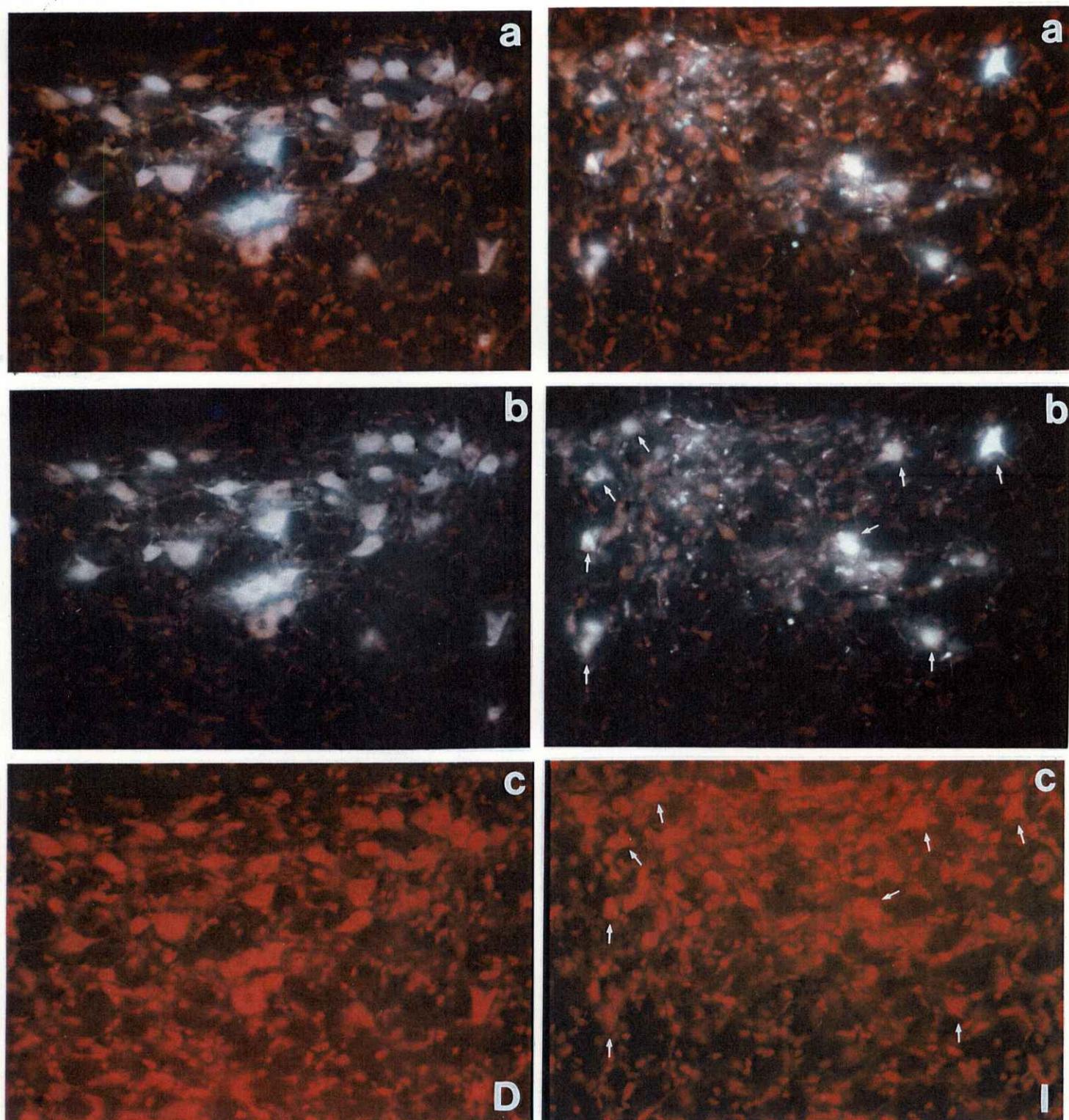


Fig. 19. Microfotografías a mayor aumento (x128) de los núcleos derecho (D) e izquierdo (I) de la figura anterior, realizadas con la técnica de doble exposición (a), con el filtro del fluoro-gold (b) y con el filtro del yoduro de propidio (c). En el núcleo izquierdo se observa un menor número de motoneuronas marcadas (flechas) tanto con el fluoro-gold como con el yoduro de propidio.

V. DISCUSION

DISCUSIÓN

1. Elección del núcleo del VI par craneal

El estudio de la localización y organización de las neuronas que constituyen los núcleos oculomotores ha estado cronológicamente ligado, por su dificultad, al progreso de las técnicas utilizadas para estudiar conexiones neuroanatómicas. Debido a que los núcleos oculomotores se encuentran en el troncoencéfalo junto a otros núcleos neuronales, células no neuronales e importantes fascículos nerviosos, y a que los límites de algunos grupos neuronales no están bien definidos, su identificación no tuvo éxito hasta Warwick (1953), que usó técnicas de degeneración neuronal retrógrada que le permitieron definir los núcleos oculomotores del mono.

Tarlov y Tarlov (1971) documentaron, utilizando también técnicas de degeneración retrógrada, que los núcleos oculomotores del gato tenían una organización diferente a la del mono, confirmando la existencia de diferencias entre diversas especies, hecho que había contribuido a la controversia en investigaciones previas. Estos autores además observaron que las técnicas de degeneración neuronal retrógrada, basadas en la distribución de la cromatolisis después de la sección nerviosa, presentaban ventajas sobre las técnicas de estimulación eléctrica para localizar los cuerpos celulares que inervan cada músculo extraocular.

En la década de los 70, la introducción de las técnicas de trazado axonal como la peroxidasa de rábano (HRP) y los trazadores fluorescentes permitió el estudio más detallado de estos núcleos. Así, en 1971, Kristensson y Olsson demostraron que la HRP tras ser inyectada en el músculo gastrocnemius de ratones, es transportada retrógradamente por los axones hasta las motoneuronas aferentes. Gacek (1974) utilizó el transporte retrógrado de la HRP para estudiar las motoneuronas de los núcleos oculomotores del gato recién nacido y documentó que

esta técnica presentaba ventajas sobre las técnicas de degeneración neuronal retrógrada, ya que permite marcar todas las neuronas, independientemente de su tamaño, por lo que éstas se pueden localizar y diferenciar claramente de las neuronas no marcadas. Sin embargo, los cambios morfológicos degenerativos que se producen después de la sección de ramas nerviosas son difíciles de evaluar al microscopio en neuronas de pequeño tamaño, y además, no todas las neuronas presentan iguales cambios morfológicos tras la sección axonal.

Posteriormente a estos estudios, la utilización de sustancias fluorescentes que también se transportan retrógradamente por los axones, después de ser inyectadas en uno o más músculos extraoculares, ha permitido obtener una idea más precisa de la posición relativa de distintos subgrupos neuronales en un mismo núcleo oculomotor (Labandeira-García y cols., 1983).

El presente estudio tenía por finalidad desarrollar un modelo experimental que permitiera cuantificar los efectos que pudieran tener determinadas sustancias neurotóxicas sobre la supervivencia de las motoneuronas que inervan los músculos extraoculares. Hemos utilizado para realizar nuestro trabajo la población de motoneuronas del núcleo del VI par craneal de la rata, que presenta varias ventajas para investigar con métodos cuantitativos los efectos de la administración de sustancias neurotóxicas sobre la supervivencia de las motoneuronas. En primer lugar, la población de motoneuronas de este núcleo inerva un único músculo, el RL ipsilateral. Además, ese músculo es fácilmente accesible a las manipulaciones experimentales, lo que permite no lesionar otros músculos extraoculares u otras estructuras del globo ocular durante la manipulación quirúrgica. También, es posible acceder a este músculo y manipularlo más de una vez, si fuera necesario. Por último, la zona del troncoencéfalo donde se localiza este núcleo, es fácilmente identificable por una serie de estructuras anatómicas que se localizan en sus proximidades, como el cuarto ventrículo y la rodilla del nervio facial, lo que nos permite preseleccionar

las secciones histológicas en las que se encuentran las motoneuronas del núcleo del VI par craneal.

2. Uso del fluoro-gold para marcar las motoneuronas del núcleo del VI par craneal

La utilización de trazadores neuronales fluorescentes aplicados a los territorios de proyección o dianas, para marcar las neuronas aferentes, permite realizar estudios cuantitativos in vivo de supervivencia neuronal (Vidal-Sanz y cols., 1988; Villegas-Pérez y cols., 1993; Peinado-Ramón, 1996; Sellés-Navarro, 1996). Debido a que en el núcleo del VI par craneal las motoneuronas coexisten con las interneuronas, de las que no es posible distinguir las usando técnicas de tinción histológica clásicas como el violeta de cresilo, y a que las sustancias neurotóxicas pueden inducir cambios del fenotipo neuronal, para poder identificar las motoneuronas, las hemos marcado previamente a cualquier manipulación experimental con un trazador neuronal fluorescente, el FG. Entre las posibles ventajas que tiene este trazador neuronal destacamos que es hidrosoluble, produce un intenso marcaje del soma celular y sus dendritas primarias, la fluorescencia no se disipa rápidamente con la exposición a rayos ultravioletas, no difunde fuera del soma celular y se transporta retrógradamente en un tiempo óptimo de aproximadamente 5-7 días (Schmued y Fallon, 1986). Además, se había sugerido que el FG puede persistir largos períodos de tiempo en el soma neuronal (Schmued y Fallon, 1986; Snyder-Keller, 1988; del Cerro y cols., 1990; Divac y Mogensen, 1990; Merchenthaler, 1991).

La técnica quirúrgica que hemos empleado para acceder al músculo RL, difiere de la utilizada por otros autores (Glicksman, 1980; Labandeira-García y cols., 1983; Cabrera y cols., 1988), que no accedieron al músculo a través de la vertiente

superior externa de la órbita, sino que lo hicieron mediante una incisión en la conjuntiva. Estos autores además producían un colapso parcial del globo ocular y extirpaban los músculos circundantes al músculo inyectado. Nuestra técnica nos permite no dañar el globo ocular, de hecho ningún animal de nuestros experimentos al ser procesado tenía alteración alguna objetivable en el mismo.

El volumen (5 microlitros) de FG al 3% que hemos inyectado en el RL de la rata era similar al que emplearon, en este mismo animal, otros autores como Glicksman (1980) y Labandeira-García y cols. (1983) que inyectaron 3 microlitros y de 4-6 microlitros respectivamente de una solución de HRP en dicho músculo, pero menor al empleado por Cabrera y cols. (1988), que inyectaban en el RL 15 microlitros de la solución de HRP. Así mismo, hemos empleado una concentración al 3% de FG que nos ha permitido obtener un buen marcaje neuronal con inapreciable lesión en el lugar de inyección. Aunque no hemos realizado estudios anatomopatológicos de los músculos inyectados, en los animales en los que tras una primera inyección de FG, su músculo RL recibía una nueva inyección bien de FG (subgrupo G del primer grupo experimental) o de DXR (tercer grupo experimental), no hemos observado ninguna alteración macroscópica muscular al realizar la segunda inyección.

En nuestro estudio hemos considerado que el intervalo de tiempo óptimo que debía transcurrir desde que aplicábamos el FG en el músculo RL, hasta que llegaba al soma de las motoneuronas del núcleo del VI par y producía un buen marcaje de las mismas, era de 7 días. Sellés-Navarro y cols. (1996) han documentado, tras aplicar FG en ambos colículos superiores y el núcleo geniculado dorsolateral de la rata, que el intervalo de tiempo óptimo que debía de transcurrir para obtener un buen marcaje retrógrado de la totalidad de la población de células ganglionares de la retina era de 7 días, ya que si utilizaban intervalos de tiempo menores (4 días),

muchas células ganglionares no se marcaban y las que lo hacían presentaban una fluorescencia muy débil.

2.1. Eficacia del fluoro-gold para marcar las motoneuronas que inervan el músculo recto lateral

En los animales que constituían el subgrupo A del primer grupo experimental hemos determinado la eficacia del FG para marcar la totalidad de la población de motoneuronas del núcleo del VI par craneal. En nuestro estudio era fundamental poder identificar la totalidad de la población de motoneuronas de manera fiable y repetible, para poder efectuar estudios cuantitativos.

Al examinar al microscopio de fluorescencia las secciones histológicas seriadas del troncoencéfalo que correspondían a estos núcleos, observábamos células que mostraban la típica fluorescencia del FG tanto en el soma celular como en sus dendritas proximales. Como el trazador neuronal sólo se había inyectado en el músculo RL, asumimos que las células marcadas corresponden a las motoneuronas que inervan este músculo. El número medio de motoneuronas marcadas con FG en estos animales fué de 271. Este número es comparable al obtenido en estudios previos que han utilizado otros trazadores neuronales como la peroxidasa de rábano (Labandeira-García y cols., 1983; Cabrera y cols., 1988) y marcadores fluorescentes como la bisbenzimidida y la DAPI-primulina (Labandeira-García y cols., 1983) inyectados en el músculo RL para estudiar estas motoneuronas, de lo que deducimos que la eficacia del FG para marcar esta población neuronal es al menos similar a la de otros trazadores neuronales. Del mismo modo, cuando se utiliza FG en otros sistemas, como el retino-tectal, el número de neuronas marcadas retrógradamente es similar al que se obtiene con otros trazadores neuronales fluorescentes y no fluorescentes (Peinado-Ramón y cols., 1996; Sellés-Navarro y cols., 1996).

En la mayoría de los animales procesados encontramos de 3-5 motoneuronas marcadas en el núcleo accesorio del VI par craneal ipsilateral, que podría ser debido a la difusión del FG hacia el músculo retractor bulbi y la captación del trazador por algunas motoneuronas que inervan este músculo. Este hecho también ha sido referido por Glicksman (1980) cuando inyectaba HRP en el músculo RL.

Cuando analizamos el tamaño de las motoneuronas constituyentes del núcleo del VI par craneal, estimamos que estas neuronas tienen un diámetro medio de 24,24 micras. Este dato concuerda con los de otros autores, así, Labandeira-García y cols. (1983) estimaron que el diámetro medio de estas motoneuronas es de 21,4 micras, mientras que Cabrera y cols. (1988) estimaron que el diámetro medio de dichas células es de 26 micras. Las diferentes técnicas para procesar el tejido utilizadas en cada estudio, podrían ser las responsables de las diferencias existentes en el tamaño neuronal. En nuestro estudio hemos observado también que el tamaño de las motoneuronas del núcleo del VI par craneal varía con la edad del animal.

2.2. Persistencia del marcaje con fluoro-gold

Aunque se ha sugerido que el FG persiste en los somas celulares durante largos períodos de tiempo (Schmued y Fallon, 1986; Snyder-Keller, 1988; del Cerro y cols., 1990; Divac y Mogensen, 1990; Merchenthaler, 1991), en nuestro estudio hemos observado en los animales del primer grupo experimental una progresiva disminución en la intensidad de la fluorescencia y el número de motoneuronas marcadas con FG a partir de los 37 días de la inyección del trazador, y a medida que aumentaba el período de supervivencia del animal. El análisis estadístico de nuestros datos documenta que tras un período de supervivencia de 67 y 97 días tras la inyección del trazador, el número de motoneuronas marcadas con FG disminuye significativamente. A los 67 días de la inyección del FG el número de estas

motoneuronas representa el 78% de las motoneuronas marcadas a los 7 días, y a los 97 días sólo permanecían marcadas un 37% de las motoneuronas marcadas a los 7 días, por lo que pensamos que el FG comienza a desaparecer de los somas neuronales a partir de los 37 días de su aplicación en el músculo RL. Estas observaciones, que difieren de lo comunicado por algunos autores (Schmued y Fallon, 1986; Snyder-Keller, 1988; del Cerro y cols., 1990; Divac y Mogensen, 1990; Merchenthaler, 1991), coinciden sin embargo, con las de otros autores que han documentado que el número de neuronas marcadas con FG en la médula espinal del ratón (Crews y Wigston, 1990), en la sustancia negra de la rata (Sauer y Oertel, 1994) y en la retina de la rata (Sellés-Navarro y cols., 1996), disminuye conforme aumenta el intervalo de tiempo tras la aplicación del trazador.

2.3. Neurotoxicidad del fluoro-gold

La progresiva disminución tanto en la intensidad del marcaje como en el número de motoneuronas marcadas con FG, en los animales procesados a los 67 y 97 días de la inyección de FG, podría deberse, bien a una pérdida del marcaje, o también a la muerte de células marcadas porque el FG tuviera un efecto neurotóxico sobre esta población neuronal. Sin embargo, los experimentos realizados en los animales del subgrupo G del primer grupo experimental han descartado esta última posibilidad, ya que hemos observado que cuando se vuelve a aplicar el FG en el músculo RL, 60 días después de la primera inyección, cuando las neuronas han perdido parte de la fluorescencia, el número de motoneuronas marcadas 7 días más tarde, era similar al obtenido en los animales del subgrupo A del primer grupo experimental, procesados solamente 7 días después de la aplicación del FG, lo que sugiere que no se ha producido muerte neuronal, porque las neuronas han vuelto a marcarse. Otro dato a favor de ausencia de muerte neuronal durante este período, es



que en los animales en los que se observaba una disminución del número de células marcadas con el tiempo de supervivencia, no se observaron células microgliales marcadas con FG, una observación característica tras procesos de muerte de neuronas previamente marcadas con trazadores fluorescentes, como el DiI, el Di-ASP (Thanos, 1991a,b) o el FG (Crews y Wigston, 1990; Rinaman y cols., 1991; Sauer y Oertel, 1994; Peinado-Ramón, 1996; Sellés-Navarro, 1996), y que nosotros hemos observado en todos los animales en los que se inyectó DXR (ver más adelante). Así, los detritus de las motoneuronas marcadas con FG son fagocitados por microglía reactiva que los incorpora en su citoplasma, tornándose de esta manera fluorescente. Por todo ello, pensamos que la pérdida del marcaje que observamos con el tiempo en nuestros experimentos podría ser debida a que el fluorocromo una vez en el soma neuronal, sufriera una pérdida de fluorescencia o que algún proceso de tipo metabólico pueda alterar su fluorescencia.

3. Administración de toxina botulínica tipo A: Ausencia de muerte neuronal

3.1. Marcaje de motoneuronas

La utilización de trazadores neuronales persistentes aplicados a los principales territorios de proyección de los axones, permite que el flujo axonal retrógrado transporte el marcador desde las terminales sinápticas hasta el citoplasma de las neuronas. Su acúmulo en el soma celular hace que sean fácilmente identificables, lo que permite estudios cuantitativos in vivo de la supervivencia neuronal, tras la inyección de sustancias tóxicas.

Debido a que los tiempos de supervivencia de los animales a los que administrábamos TxBA, superaba el intervalo óptimo del marcaje con FG, que como

hemos visto anteriormente comenzaba a desaparecer del soma neuronal a partir de los 37 días de su inyección intramuscular, efectuamos la inyección del trazador en el músculo RL después de la toxina y siempre una semana antes de procesar al animal.

Aún después de administrar dosis intramusculares de TxBA que superan ampliamente las utilizadas en la clínica, y que se sabe que producen una pérdida de contacto funcional efectivo entre la neurona y el músculo, hemos observado que se produce con normalidad la captación y transporte retrógrado del FG por las motoneuronas del núcleo del VI par craneal. La captación de FG por los terminales axonales se produce por un mecanismo de endocitosis vesicular (Schmued y Fallon, 1986; Snyder-Keller, 1988). Kristensson y Olsson (1978) estudiaron si la interrupción de la actividad sináptica *in vivo*, podía influir en el transporte retrógrado de moléculas, tales como la peroxidasa de rábano (HRP). Estos autores, para bloquear la transmisión nerviosa, inyectaron TxBA en la región izquierda de los músculos de los vibrissae de ratones y posteriormente administraron HRP, bien en los músculos de los vibrissae o vía intravenosa. En todos los casos observaron que la incorporación de la HRP en las organelas del axón terminal y su transporte retrógrado al soma de las neuronas del núcleo del facial ocurría normalmente, en contra de sus expectativas iniciales, ya que estos autores habían postulado que si la TxBA afectaba la exocitosis, también estaría inhibida la endocitosis compensatoria debida al reciclaje de membranas y, por tanto, el transporte de macromoléculas como la HRP, que son captadas por un mecanismo de endocitosis. Similarmente a las conclusiones obtenidas por estos autores, podemos decir que la captación de FG por las motoneuronas del VI par craneal y su transporte retrógrado no se ven afectados por la inyección de TxBA.

3.2. Efectos axotomy-like

Aunque estudios previos han sugerido que la TxBA no daña directamente los axones o terminales motores (Simpson, 1989), existen datos que indican que en la población de motoneuronas se producen alteraciones similares a las observadas después de daño axonal. Estos cambios semejantes a los observados tras la axotomía (axotomy-like), incluyen alteraciones en el metabolismo (Watson, 1969), morfología (Summer y Watson, 1971) y propiedades electrofisiológicas (Pinter y cols., 1991; Moreno y cols., 1994) de las motoneuronas. Se desconocían hasta el presente estudio los efectos que podría tener la administración intramuscular de TxBA sobre la supervivencia de la población de motoneuronas que inervan la musculatura extrínseca del globo ocular.

Para estudiar el efecto de la TxBA sobre la supervivencia de las motoneuronas del núcleo del VI par craneal, hemos utilizado animales de 21 días de edad, ya que en la clínica se utiliza la TxBA en niños de corta edad para el tratamiento del estrabismo y que se ha descrito que en animales jóvenes las motoneuronas son más proclives a sufrir muerte neuronal tras la axotomía. Así, Baker y cols. (1981) no observaron muerte de motoneuronas tras la sección crónica del VI par craneal en el núcleo del motor ocular externo del gato adulto y, sin embargo, Pásaro y cols. (1985) han documentado que dos meses después de la sección del VI par craneal en gatos de una semana de edad, sólo sobrevive el 50% de la población de motoneuronas del núcleo del motor ocular externo. Nosotros, no hemos utilizado animales de edad inferior a 21 días debido a dificultades técnicas, como son el problema de la separación de las madres y el tamaño tan pequeño del músculo recto lateral de las ratas neonatales.

3.3. Supervivencia neuronal. Transporte retrógrado

Aunque en todos los animales del segundo grupo experimental se han empleado dosis farmacológicas de TxBA y siempre relativamente muy superiores a las empleadas en el tratamiento del estrabismo en humanos, al examinar al microscopio de fluorescencia las secciones histológicas del troncoencéfalo correspondientes a estos núcleos, no se han observado diferencias ni en la intensidad de fluorescencia ni en el número de motoneuronas entre el núcleo izquierdo correspondiente al músculo RL izquierdo, donde se había inyectado la TxBA y el FG y el núcleo derecho o control del mismo animal, donde sólo se había inyectado el FG. Esta observación se repitió en todos los animales del segundo grupo experimental, independientemente de la dosis de TxBA administrada y del tiempo de supervivencia del animal tras la inyección de la toxina. En nuestro estudio, tampoco observamos en ningún caso la aparición de células de la microglía en el núcleo del VI par, ni a corto ni a largo plazo, que sugirieran proceso alguno de degeneración o muerte neuronal. Este último hecho, también fué observado por Watson (1969), quien señaló que tras la inyección de TxBA en la lengua de la rata adulta no se producía un acúmulo de células microgliales activadas alrededor de las neuronas del núcleo del nervio hipogloso.

Existen estudios que han documentado que la TxBA llega al soma neuronal, posiblemente por transporte retrógrado (Welhöner, 1989), y que probablemente actúe de alguna manera en el mismo (Moreno-López y cols., 1994). El patrón electrofisiológico que muestran las motoneuronas del núcleo del VI par craneal del gato adulto tras la inyección de TxBA en el músculo RL, donde se produce, aunque de forma transitoria, un bloqueo de la transmisión neuromuscular, es diferente al que se observa tras la axotomía, donde también se produce un bloqueo de la transmisión neuromuscular, aunque más duradero (Moreno-López y cols., 1994). Por ello, estos

autores han postulado que la diferente respuesta de las motoneuronas del núcleo del VI par craneal a la inyección de TxBA y a la axotomía sería debida a que la toxina no actúa solamente en el terminal presináptico, sino que también tendría una acción a nivel somático.

3.4. Efectos derivados de la administración de toxina botulínica

Dada la dificultad para valorar en la rata de forma objetiva los efectos derivados de la administración de TxBA en el músculo RL, tales como la aparición de endotropia o de ptosis, que sí pueden ser valoradas al inyectar TxBA en otros mamíferos como el mono (Scott y cols., 1973), y aunque hemos utilizado la TxBA comercializada para uso humano y que seguimos las normas del fabricante para su reconstitución y conservación una vez reconstituido el preparado, creímos que era conveniente obtener un signo objetivo que nos permitiera valorar la eficacia de la TxBA. Por ello, inyectamos TxBA en el músculo masetero izquierdo de 5 animales. A los 21 días de la inyección de la toxina en el masetero, el peso de éstos animales era ostensiblemente menor que el de otros de su misma edad que habían recibido la toxina sólo en el músculo RL, lo que indica que se había producido una parálisis flácida del músculo masetero izquierdo que había repercutido en los mecanismos de masticación del animal, viéndose afectado su proceso de alimentación.

4. Administración de doxorubicina: Muerte neuronal

4.1. Marcaje retrógrado: Utilidad para estudiar efectos neurotóxicos

El marcaje con FG de las motoneuronas del núcleo del VI par craneal en este grupo de animales se realizó antes que la inyección de la DXR, ya que si

inyectáramos en primer lugar esta droga y a continuación el FG, era posible que no se marcaran las motoneuronas y sería por lo tanto difícil valorar el efecto neurotóxico de dicha sustancia. Sauer y Oertel (1994) habían estudiado la degeneración neuronal que se produce en la sustancia negra de la rata tras la inyección de una sustancia tóxica, la 6-hidroxidopamina, en el núcleo estriado utilizando la inyección previa de FG en dicho núcleo para marcar las neuronas nigricas. Estos autores observaron que si inyectaban la 6-hidroxidopamina antes que el FG en el estriado no se producía un marcaje adecuado de las células de la sustancia negra.

En nuestro trabajo hemos cuantificado el efecto de la administración de distintas dosis de DXR, una sustancia con probada actividad neurotóxica (Bigotte y Olsson, 1983; Yamamoto y cols., 1984b) y miotóxica (Baker y Wirtschafter, 1987; McLoon y Wirtschafter, 1988), sobre la supervivencia de las motoneuronas del núcleo del VI par craneal cuando es transportada retrógradamente por flujo axoplásmico, tras su inyección en el músculo RL de la rata.

4.2. Degeneración selectiva de neuronas

La primera demostración de degeneración neuronal experimental por una sustancia tóxica (ricina) transportada por flujo axoplásmico la llevaron a cabo Harper y cols. en 1980. Posteriormente Wiley y cols. (1982) confirmaron el "transporte suicida" de ciertas sustancias (ricina, abrina y modeccina). En 1983, Bigotte y Olsson observaron cambios degenerativos en las neuronas del núcleo del nervio hipogloso tras la inyección de DXR en la lengua del ratón. Estos cambios degenerativos neuronales tras la inyección intramuscular de DXR fueron también descritos por Yamamoto y cols. (1984b), siendo estos autores los primeros que documentaron muerte neuronal tras la administración de DXR tanto en el nervio

ciático como en el músculo soleus-gastrocnemius, aunque no realizaron estudios cuantitativos de la misma. Sin embargo, McLoon y cols. (1994) no observaron muerte neuronal en el núcleo del facial, tras la inyección de DXR en el músculo orbicular del conejo y postularon que las motoneuronas del núcleo adulto del facial son capaces de sobrevivir, en vez de degenerar, ante varios tipos de lesiones (LaVelle y LaVelle, 1958; Lieberman, 1971; McLoon y LaVelle, 1981), a las que no sobrevivirían otras neuronas como las de ganglios sensoriales (Kato y cols., 1988), las motoneuronas del núcleo del hipogloso (Bigotte y Olsson, 1986), las motoras espinales (McLoon y LaVelle, 1981; Yamamoto y cols., 1984b).

Al examinar al microscopio de fluorescencia las secciones histológicas del troncoencéfalo de los animales del tercer grupo experimental, hemos observado que en los núcleos del VI par craneal correspondientes a los músculos en los que se inyectó DXR era evidente la disminución del número de motoneuronas y la aparición de pequeñas células de morfología fagocítica fuertemente marcadas con FG. Estas últimas, sólo se observaron en el núcleo ipsilateral a la inyección de DXR, y no en el núcleo contralateral en el que solamente se inyectó el trazador, lo que sugiere un proceso de degeneración de las motoneuronas y una fagocitosis de sus detritus por células de la microglía que incorporan FG en su citoplasma y se vuelven intensamente fluorescentes. Células con fenotipo similar se han observado también en otros estudios que han empleado técnicas de trazado neuronal con marcadores fluorescentes para investigar la degeneración retrógrada en la retina (Thanos, 1991a,b), médula espinal (Crews y Wigston, 1990; Rinaman y cols., 1991), y sustancia negra (Sauer y Oertel, 1994) y se interpretan como fagocitos no astrocíticos incluidos en la microglía (Crews y Wigston, 1990; Rinaman y cols., 1991; Thanos, 1991b; Sauer y Oertel, 1994).

La desaparición de células marcadas con FG, así como la aparición de pequeñas células de morfología fagocítica fuertemente marcadas, sugieren un

proceso de degeneración neuronal producido por la simple inyección de DXR. En el núcleo del VI par craneal derecho correspondiente al músculo RL ipsilateral, donde sólo se inyecta el trazador, no aparecen estas células de morfología fagocítica, lo que indica que su aparición no es debida ni al marcaje retrógrado de las mismas, ni a la mera captación del FG desde el espacio extracelular, como podría ocurrir si el FG pudiera salir de las neuronas dañadas pero supervivientes, sino que sólo es debido a la fagocitosis de los detritus celulares tras la degeneración de las neuronas marcadas (Sauer y Oertel, 1994).

Para investigar si la disminución del número de motoneuronas del núcleo del VI par craneal marcadas con FG tras la inyección con DXR del músculo RL, era debida a la acción neurotóxica de la DXR y no se trataba de una desaparición del marcaje, realizamos un proceso de doble marcaje. Para ello, las secciones del troncoencéfalo de un animal ya procesado, del subgrupo C, al que se le habían administrado 200 microgramos de DXR 21 días antes de su muerte, se tiñeron con yoduro de propidio y observamos que el número de células grandes (presumiblemente motoneuronas) que se teñían en el núcleo del VI par craneal izquierdo que correspondía al músculo inyectado con DXR, era menor que el observado en el núcleo derecho o control, lo que nos indicaba que parte de las motoneuronas de ese núcleo habían muerto como consecuencia de la administración de DXR.

4.3. Cuantificación de la muerte neuronal: Mecanismo de lesión

El número medio de motoneuronas supervivientes en el núcleo del VI par izquierdo o experimental se había reducido a un 77-80% con respecto al núcleo contralateral control, en los animales procesados a los 7 días de la inyección de DXR. Este porcentaje se redujo drásticamente en los animales examinados a los 14

días tras la administración de DXR, siendo en este caso del 35% cuando administramos 100 microgramos, del 23% para 200 microgramos y del 18% para 300 microgramos de DXR. Así pues, entre la primera y la segunda semana post-inyección, se produjo la muerte de gran parte de la población de motoneuronas del núcleo del VI par craneal. Este proceso de muerte neuronal inducido por la DXR, no progresó entre la segunda y tercera semana, ya que el porcentaje de supervivencia a los 21 días de la administración de la DXR fué del 40% para 100 microgramos, del 22% para 200 microgramos y del 16% para 300 microgramos de DXR. La observación de que la muerte neuronal, para un mismo período de supervivencia, se incrementó según aumentaba la dosis administrada de DXR sugiere que el efecto neurotóxico es dosis dependiente.

Desconocemos el mecanismo responsable de la muerte neuronal observada en nuestros experimentos. Estudios previos han sugerido que la DXR se transporta retrógradamente hasta el soma neuronal (Bigotte y Olsson, 1983; Yamamoto y cols., 1984b) sobre el que tendría una acción directa, ya que se intercala entre la doble hélice de la estructura del ADN, inhibiendo la síntesis de ARN mensajero e indirectamente la síntesis de proteínas vitales para la célula (Pigram y cols., 1972; Dimarco, 1975). Por todo ello, parece razonable asumir que la principal lesión que produce la DXR, una vez que entra en las neuronas, es la alteración de las funciones del ADN y del ARN en el núcleo y en los ribosomas, como ha sido admitido en otros tipos de células (Brown, 1978).

Se ha documentado también, que la inyección intramuscular de DXR induce una miectomía química (Baker y Wirtschafter, 1987; Wirtschafter, 1991; McLoon y cols., 1994), por lo que se podría pensar que la muerte neuronal que observamos sería debida en parte a la eliminación del territorio diana de las motoneuronas del núcleo del VI par. Sin embargo, Baker y cols. (1981) documentaron que tras la sección crónica del VI par craneal del gato adulto, no se observaba la existencia de muerte

de motoneuronas en el núcleo del motor ocular externo. Por ello, pensamos que el efecto tóxico directo de la DXR es el principal responsable de la muerte de las motoneuronas del núcleo del VI par craneal.

4.4. Perspectivas futuras y aplicabilidad clínica

4.4.1. En la investigación de enfermedad de motoneuronas experimental

Nuestros experimentos documentan que el transporte axonal retrógrado de DXR puede ser usado para inducir daño selectivo de neuronas y de esta forma conseguir un modelo experimental de enfermedad de motoneuronas, ya que proporciona una ruta para la entrada del agente neurotóxico en el SNC. Este hecho ya fué sugerido por Bigotte y Olsson en 1983.

Una de las hipótesis que intenta explicar la patogenia de las enfermedades degenerativas de motoneuronas postula, que estas neuronas motoras, debido a que sus axones terminales se extienden fuera del SNC, podrían estar expuestas a agresiones por agentes endógenos y exógenos que no podrían actuar en otras neuronas centrales sin extensiones periféricas porque no atraviesan la barrera hematoencefálica (Broadwell y Brightman, 1976). Si un agente nocivo accede a los axones motores o a las uniones neuromusculares y puede ser transportado por flujo axoplásmico retrógrado, podría alterar selectivamente las motoneuronas, pudiendo ser agente etiológico de enfermedad de las mismas.

4.4.2. Para valorar la eficacia de factores neuroprotectores

El modelo experimental de muerte neuronal por transporte axonal retrógrado de DXR que hemos descrito en este estudio, nos puede permitir en un futuro investigar la eficacia de ciertas sustancias neuroprotectoras, en la prevención o

disminución de los efectos degenerativos producidos por otras sustancias que actúan como neurotóxicos.

4.4.3. Para el tratamiento de desórdenes neuromusculares

La DXR es usada comúnmente para el tratamiento de neoplasias malignas, pero a finales de la década de los 80 y debido a sus probados efectos neurotóxico (Bigotte y Olsson, 1983; Yamamoto y cols., 1984b) y miotóxico (Baker y Wirtschafter, 1987; McLoon y Wirtschafter, 1988), se ha empezado a utilizar como tratamiento experimental en el blefaroespasma y el espasmo hemifacial (Wirtschafter, 1991). Actualmente, la denervación química del orbicular con TxBA constituye el tratamiento de primera elección para el blefaroespasma (Osako y Keltner, 1991), debido a que la miectomía quirúrgica del orbicular presenta problemas inherentes a la técnica y a veces tiene resultados incompletos. Sin embargo, la denervación química temporal con TxBA ofrece un excelente resultado en aproximadamente un 70% de los pacientes tratados, pero sus efectos no son permanentes, durando sólo una media de 12 semanas (Patrinely y cols., 1988). La miectomía química con DXR podría constituir una alternativa a estos dos tratamientos, ya que tiene resultados permanentes (Wirtschafter, 1991).

La documentación, tanto en estudios animales (McLoon y cols., 1991) como en humanos (McLoon y cols., 1993), de que no se producen lesiones en los nervios y otras estructuras adyacentes al músculo orbicular, tras la inyección intramuscular de DXR, así como de que no se observa muerte neuronal en el núcleo del facial del conejo, después de la administración en el párpado de esta droga, parecían ofrecer seguridad clínica a este novedoso tratamiento (McLoon y cols., 1994). Sin embargo, la utilización clínica de esta sustancia se encuentra todavía en estudio, pues su inyección produce efectos colaterales en la piel palpebral relacionados con la dosis de DXR administrada (McLoon y cols., 1995). Así mismo, teniendo en cuenta los

resultados de nuestro estudio y aunque McLoon y cols. (1994) han indicado que la DXR no produce muerte neuronal, pensamos que quizás las técnicas utilizadas para investigar ésta, no han sido las adecuadas y que sería conveniente realizar un estudio de supervivencia de dichas neuronas identificando previamente de manera fiable las neuronas del núcleo del facial responsables de la inervación del orbicular, para poder determinar posteriormente si después de la administración intramuscular de distintas dosis de DXR se produce muerte o alteración irreversible de las mismas.

Futuras investigaciones deben determinar, a corto y largo plazo, la seguridad y eficacia de la miectomía química por DXR, así como el protocolo de inyección óptimo y posibles vías que faciliten su difusión y mejoren la captación de la droga por las células musculares.

VI. CONCLUSIONES

CONCLUSIONES

Basándonos en los resultados obtenidos en los experimentos realizados en esta Tesis Doctoral, podemos concluir:

1. La inyección de fluoro-gold en el músculo recto lateral de la rata produce, 7 días después, un marcaje homogéneo del soma y dendritas proximales de las motoneuronas del núcleo del VI par craneal. Mediante esta técnica hemos estimado que el número medio de motoneuronas que conforman este núcleo es de 271 ± 5 (Media \pm ESM).

2. El fluoro-gold es un trazador neuronal fiable para estudios a corto plazo de supervivencia neuronal en el núcleo del VI par craneal de la rata.

3. El fluoro-gold no es un trazador neuronal persistente, pues a los 37 días de su inyección en el músculo recto lateral de la rata, su fluorescencia comienza a disminuir en intensidad y desaparecer de los somas de las motoneuronas del núcleo del VI par craneal.

4. El fluoro-gold no tiene efectos neurotóxicos aparentes sobre la población de motoneuronas del núcleo del VI par de la rata.

5. El marcaje de la población de motoneuronas del núcleo del VI par craneal de la rata con fluoro-gold es un método válido para cuantificar la muerte neuronal inducida por agentes neurotóxicos.

6. La inyección en el músculo recto lateral de toxina botulínica tipo A en ratas jóvenes no altera el transporte axonal retrógrado ni la captación de fluoro-gold por las motoneuronas del núcleo del VI par craneal.

7. La administración en el músculo recto lateral de ratas de 21 días de edad, de diferentes dosis de toxina botulínica tipo A no produce una disminución del número de motoneuronas en el núcleo del VI par craneal, durante los 90 días posteriores a la inyección. Por lo tanto, podemos decir que, la inyección de toxina botulínica tipo A en el músculo recto lateral no produce muerte neuronal en la población de motoneuronas estudiada, ni a corto ni a largo plazo.

8. La doxorubicina ejerce un efecto neurotóxico potente sobre la población de motoneuronas del núcleo del VI par craneal de la rata, ya que induce la muerte de una gran parte de estas motoneuronas, cuando se administra en el músculo recto lateral.

9. Este efecto neurotóxico se manifiesta a partir de la primera semana, y es máximo a las dos semanas de la administración de la doxorubicina, siendo además mayor cuanto más alta es la dosis administrada de esta sustancia.

VII. BIBLIOGRAFIA

BIBLIOGRAFIA

- Adelman, H.B. (1927). The development of the eye muscles of the chick. *J. Morphol.*, 44: 29-87.
- Adler, R. (1994). La musculatura extraocular. En: *Fisiología del Ojo* (W.M. Hart, ed.). Mosby/Doyma, Madrid, pp. 103-199.
- Akagi, Y. (1978). 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: 745-762.
- Bach, L. (1899). Zur lehre von den augenmuskellahmungen und den storungen der pupillenbewegung. *Albrecht v. Graefe's Archiv für Ophthalmologie*, 47: 339-386.
- Baker, L. y Wirtschafter, J.D. (1987). Experimental doxorubicin myopathy: A permanent treatment for eyelid spasms?. *Arch. Ophthalmol.*, 105: 1265-1268.
- Baker, R., Delgado-García, J.M. y McCrea, R.A. (1981). Morphological and physiological effects of axotomy on cat abducens motoneurons. En: *Synaptic Plasticity of the Central Nervous System* (H. Flohr y W. Precht, eds.). Elsevier/North Holland, Amsterdam, pp. 51-63.
- Baker, R., McCrea, R.A. y Spencer, R.F. (1980). Synaptic organization of cat accessory abducens nucleus. *J. Neurophysiol.*, 43: 771-791.
- Bellamy, W.T., Dorr, R., Dalton, W. y Alberts, D.S. (1988). Direct relation of DNA lesions in multidrug resistant human myeloma cells to intracellular doxorubicin concentration. *Cancer Res.*, 48: 6360-6364.
- Bentivoglio, M., Kuypers, H.G.J.M. y Catsman-Berrevoets, C.E. (1980a). Retrograde neuronal labeling by means of bisbenzidine and Nuclear Yellow (Hoeschst S769121): measures to prevent diffusion of the tracers out of retrogradely labeled neurons. *Neurosci. Lett.*, 18: 19-24.
- Bentivoglio, M., Kuypers, H.G.J.M., Catsman-Berrevoets, C.E., Loewe, H. y Dann, O. (1980b). Two new fluorescent retrograde neuronal tracers which are transported over long distances. *Neurosci. Lett.*, 18: 25-30.

- Bentivoglio, M., Van der Kooy, D. y Kuypers, H.G.J.M. (1979). The organization of the efferent projections of the substantia nigra in the rat. A retrograde fluorescent double labelling study. *Brain Res.*, 174: 1-17.
- Bernheimer, S. (1897). Experimentelle studien zur kenntniss der inervation der inneren und ausseren vom oculomotorius versorgten muskeln des auges. *Albrecht v. Graefe's Archiv für Ophthalmologie*, 44: 481-525.
- Biglan, A.W., Burnstine, R.A., Rogers, G.L. y Saunders, R.A. (1989). Management of strabismus with botulinum A toxin. *Ophthalmology*, 96: 935-943.
- Bigotte, L. y Olsson, Y. (1982). Retrograde transport of doxorubicin (adriamycin) in peripheral nerves of mice. *Neurosci. Lett.*, 32: 217-221.
- Bigotte, L. y Olsson, Y. (1983). Cytotoxic effects of Adriamycin on mouse hypoglossal neurons following retrograde axonal transport from the tongue. *Acta Neurophathol.*, 61: 161-168.
- Blanks, R.H.I., Precht, W. y Torigoe, Y. (1983). Afferent projections to the cerebellar flocculus in the pigmented rat demonstrated by retrograde transport of horseradish peroxidase. *Exp. Brain Res.*, 52: 293-306.
- Blasi, J., Chapman, E.R., Link, E., Binz, T., Yamasaki, S., De Camilli, P., Südhof, T.C., Niemann, H. y Jahn, R. (1993). Botulinum neurotoxin A selectively cleaves the synaptic protein SNAP-25. *Nature*, 365: 160-163.
- Bleicher, J.N., Haynes, W. y Massop, D. (1984). The delineation of Adriamycin extravasation using fluorescence microscopy. *Plast. Reconstr. Surg.*, 74: 114-116.
- Blum, R.H. y Carter, S.K. (1974). Adriamycin: a new anticancer drug with significant clinical activity. *Ann. Inter Med.*, 80: 346-359.
- Broadwell, R.D. y Brightman, M.W. (1976). Entry of peroxidase into neurons of the central and peripheral nervous systems from extracerebral and cerebral blood. *J. Comp. Neurol.*, 166: 257-284.
- Broadwell, R.D. y Brightman, M.W. (1979). Cytochemistry of undamaged neurons transporting exogenous protein in vivo. *J. Comp. Neurol.*, 185: 31-74.

- Brouwer, B. (1918). Klinisch-anatomische untersuchung über den oculomotoriuskern. *Zeitschrift für die gesamte Neurologie und Psychiatrie*, 40: 152-193.
- Brown, J.R. (1978). Adriamycin and related anthracycline antibiotics. *Prog. Med. Chem.*, 15: 125-164.
- Bruno, N.A. y Slate, D.L. (1990). Effect of exposure to calcium entry blockers on doxorubicin accumulation and cytotoxicity in multi-drug resistant cells. *J. Natl. Cancer Inst.*, 82: 419-424.
- Bucciarelli, E. (1988). Mammary tumor induction in male and female Sprague-Dawley rats by Adriamycin and Daunomycin. *J. Natl. Cancer Inst.*, 66: 81-84.
- Büttner-Ennever, J.A. (1977). Pathways from the pontine reticular formation to structures controlling horizontal and vertical eye movements in the monkey. En: *Control of Gaze by Brainstem Neurons* (R. Baker y A. Berthoz, eds.). Elsevier/North Holland, New York, pp. 89-98.
- Büttner-Ennever, J.A. (1981). Vestibulo-oculomotor organization. En: *Progress in Oculomotor Research* (A.F. Fuchs y W. Becker, eds.). Elsevier/North Holland, New York, pp. 361-370.
- Büttner-Ennever, J.A., y Akert, K. (1981). Medial rectus subgroups of the oculomotor nucleus and their abducens internuclear input in the monkey. *J. Comp. Neurol.*, 197: 17-27.
- Burgen, A.S., Dickens, F. y Zatman, L.J. (1949). The action of botulinum toxin on the neuromuscular junction. *J. Physiol.*, 109: 10-24.
- Cabrera, B., Portillo, F., Pásaro, R. y Delgado-García, J.M. (1988). Location of motoneurons and internuclear neurons within the rat abducens nucleus by means of horseradish peroxidase and fluorescent double labeling. *Neurosci. Lett.*, 87: 1-6.
- Cho, E.S. (1977). Toxic effects of Adriamycin on the ganglia of the peripheral nervous system: a neuropathological study. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.*, 36: 907-915.

- Cho, E.S., Spencer P.S., Jortner, B.S. y Schaumburg H.H. (1980). A single intravenous injection of doxorubicin (adriamycin) induces sensory neuropathy in rats. *Neurotoxicology*, 1: 583-591.
- Cohen, M. (1979). Amelioration of Adriamycin skin necrosis: An experimental Study. *Cancer Treat. Rep.*, 63: 1003-1004.
- Crews, L.L. y Wigston, D.J. (1990). The dependence of motoneurons on their target muscle during postnatal development of the mouse. *J. Neurosci.*, 10: 1643-1653.
- DasGupta, B.R. (1989). The structure of botulinum neurotoxin. En: *Botulinum Neurotoxin and Tetanus Toxin* (L.L. Simpson, ed.). Academic Press, New York, pp. 53-67.
- De la Cruz, R.R., Baker, R. y Delgado-García, J.M. (1991). Behavior of cat abducens motoneurons following the injection of toxic ricin into the lateral rectus muscle. *Brain Res.*, 544: 260-268.
- De la Cruz, R.R., Escudero, M. y Delgado-García, J.M. (1989). Behaviour of medial rectus motoneurons in the alert cat. *Eur. J. Neurosci.*, 1: 288-295.
- Del Cerro, M., Jiang, L.Q., Wiegand, S.J. y Lazar, E. (1990). In vivo staining of the mammalian retina by means of a simple fluorescent method. *J. Neuroscience Methods*, 32: 81-86.
- Del Cerro, M., Notter, M.F., Wiegand, S.J., Jiand, L.Q. y del Cerro, C. (1988). Intraretinal transplanation of fluorescently labeled retinal cell suspensions. *Neurosci. Lett.*, 92: 21-26.
- Del Cerro, M. y Snider, R.S. (1967). Studies on Dilantin intoxication. Ultrastructural analogies with the lipoidoses. *Neurology*, 17: 452-456.
- Delgado-García, J.M., del Pozo, F. y Baker, R. (1986a). Behavior of neurons in the abducens nucleus of the alert cat. I. Motoneurons. *Neuroscience*, 17: 929-952.
- Delgado-García, J.M., del Pozo, F. y Baker, R. (1986b). Behavior of neurons in the abducens nucleus of the alert cat. II. Internuclear neurons. *Neuroscience*, 17: 953-973.

- Delgado-García, J.M., Evinger, C., Escudero, M. y Baker, R. (1990). Behavior of accessory abducens and abducens motoneurons during eye retraction and rotation in the alert cat. *J. Neurophysiol.*, 64: 413-422.
- Dieringer, N., Cochran, S.L. y Precht, W. (1983). Differences in the central organization of gaze stabilizing reflexes between frog and turtle. *J. Comp. Physiol.*, 153: 495-508.
- Dell'Osso, L.F. y Daroff, R.B. (1993). Características y técnicas de registro de los movimientos oculares. En: *Neurooftalmología* (J.S. Glaser, ed.). Ediciones científicas y técnicas, Madrid, pp. 269-286.
- Dimarco, A. (1975). Adriamycin: mode and mechanism of action. *Cancer Chemother Rep.*, 6: 91-106.
- Divac, I. y Mogensen, J. (1990). Long-term retrograde labelling of neurons. *Brain Res.*, 524: 339-341.
- Dolly, J.O. (1992). Peptide toxins that alter neurotransmitter release. En: *Handbook of Experimental Pharmacology*, Vol. 102, Selective Neurotoxicity (H. Herken y F. Hucho, eds.). Springer, Berlin, pp. 681-717.
- Dolly, J.O., Black, J.D. y Williams, R.S. (1984). Acceptors for botulinum neurotoxin reside on motor nerve terminals and mediate its internalization. *Nature*, 307: 457-460.
- Doroshov, J.M., Tallent, C., y Schechter, J.E. (1985). Ultrastructural features of Adriamycin-induced skeletal and cardiac muscle toxicity. *Am. J. Pathol.*, 118: 288-297.
- Dreyer, F., Mallart, A. y Brigant, J.L. (1983). Botulinum A toxin and tetanus toxin do not affect presynaptic membrane currents in mammalian motor nerve endings. *Brain Res.*, 270: 373-375.
- Duchen, L.W. y Strich, S.J. (1968). The effects of botulinum toxin on the pattern of innervation of skeletal muscle in the mouse. *Q. L. Exp. Physiol.*, 53: 84-89.
- Dunlop, D., Pittar, G. y Dunlop, C. (1988). Botulinum toxin in ophthalmology. *Austr. N.J. J. Ophthalmol.*, 16: 15-20.

- Edinger, L. (1885). Ueber den verlauf der zentralen hirnnervenbahnen. *Archiv für Psychiatrie und Nervenkrankheiten*, 16: 858-859.
- Egorin, M.J., Clawson R.E., Cohen, J.L., Ross, L.A. y Bachur, N.R. (1980). Cytofluorescence localization of anthracycline antibiotics. *Cancer Res.*, 40: 4669-4676.
- Egorin, M.J., Hildebrand, R.C., Cimino, E.F. y Bachur, N.R. (1974). Cytofluorescence localization of Adriamycin and daunorubicin. *Cancer Res.*, 34: 2243-2245.
- Ellenhorn, M.J. y Barceloux, D.G. (1988). En: *Medical Toxicology. Diagnosis and Treatment of Human Poisoning* (M.J. Ellenhorn y D.G. Barceloux, eds.). Elsevier, New York, pp. 1185-1187.
- Elston, J.S. (1988). The clinical use of botulinum toxin. *Seminars in Ophthalmology*, 4: 249-260.
- Escudero, M. y Delgado-García, J.M. (1988). Behavior of reticular, vestibular and prepositus neurons terminating in the abducens nucleus of the alert cat. *Expl. Brain Res.*, 71: 218-222.
- Evinger, C. (1988). Extraocular motor nuclei: location, morphology and afferents. En: *Neuroanatomy of the Oculomotor System. Reviews of Oculomotor Research* (J.A. Büttner-Ennever, ed.). Elsevier, Amsterdam, pp. 81-118.
- Evinger, C., Graf, W.M. y Baker, R. (1987). An extra and intracellular HRP analysis of the organization of extraocular motoneurons and internuclear neurons in the guinea pig and rabbit. *J. Comp. Neurol.*, 262: 429-445.
- Fite, K.V., Reiner, A. y Hunt, S.P. (1979). Optokinetic nystagmus and the accessory optic system of pigeon and turtle. *Brain. Behav. Evol.*, 16: 192-202.
- Flanders, M., Tischler, A. y Wise, J. (1987). Injection of type A botulinum toxin into extraocular muscles for correction of strabismus. *Can. J. Ophthalmol.*, 22: 212-217.
- Frueh, B.R., Felt, D.P., Wojno, T.H. y Musch, D.C. (1984). Treatment of blepharospasm with botulinum toxin: A preliminary report. *Arch. Ophthalmol.*, 102: 1464-1468.

- Gacek, R.R. (1974). Localization of neurons supplying the extraocular muscles in the kitten using horseradish peroxidase. *Exp. Neurol.*, 44: 381-403.
- Gacek, R.R. (1977). Localization of brainstem neurons projecting to the oculomotor nucleus in the cat. *Exp. Neurol.*, 57: 725-749.
- Gilbert, P.W. (1947). The origin and development of the extrinsic ocular muscles in the domestic cat. *J. Morphol.*, 81: 151-193.
- Glicksman, M.A. (1980). Localization of motoneurons controlling the extraocular muscles of the rat. *Brain Res.*, 188: 53-62.
- Gómez de Liaño, R. (1995). Tratamiento del estrabismo con toxina botulínica. *St. Ophthalmol.*, 1: 75-79.
- Gómez de Liaño, R., Medin, J. y Cuevas, J.A. (1996). Alteraciones anatomopatológicas de la toxina botulínica en la musculatura ocular extrínseca del perro. *Arch. Soc. Esp. Oftalmol.*, (en prensa).
- Gómez de Liaño, R., Pérez Santonja, J.J. y Zato, M. (1991). Tratamiento del estrabismo con toxina botulínica. *Arch. Soc. Esp. Oftalmol.*, 60: 451-456.
- Gómez-Segade, L.A. y Labandeira-García, J.L. (1983). Location and quantitative analysis of the motoneurons innervating the extraocular muscles of the guinea-pig, using horseradish peroxidase (HRP) and double or triple labelling with fluorescent substances. *J. Hirnforsch.*, 24: 613-626.
- Grantyn, A., Grantyn, R., Gaunitz, U. y Robine, K.P. (1980). Sources of direct excitatory and inhibitory inputs from the medial rhombencephalic tegmentum to lateral and medial rectus motoneurons in the cat. *Exp. Brain Res.*, 39: 49-61.
- Grantyn, A., Ong-Meang, J. y Berthoz, A. (1987). Reticulo-spinal neurons participating in the control of synergic eye and head movements during orienting in the cat. II. Morphological properties as revealed by intra-axonal injections of horseradish peroxidase. *Exp. Brain Res.*, 66: 355-377.
- Grantyn, R., Baker, R. y Grantyn, A. (1980). Morphological and physiological identification of excitatory pontine reticular neurons projecting to the cat abducens nucleus and spinal cord. *Brain Res.*, 198: 221-228.

- Graybiel, A.M. (1977). Organization of oculomotor pathways in the cat and rhesus monkey. En: Control of Gaze by Brainstem Neurons (R. Baker y A. Berthoz, eds.). Elsevier/North Holland, New York, pp. 79-88.
- Harper, C.G., Gonatas, J.O., Mizutani, T. y Gonatas, N.K. (1980). Retrograde transport and effects of toxic ricin in the autonomic nervous system. *Lab. Invest.*, 42: 396-404.
- Hensen, V. y Völckers, C. (1878). Ueber den Ursprung der accomodationsnerven nebst bemerkungen über die function der wurzeln des nervus oculomotorius. *Albrecht v. Graefe's Archiv für Ophthalmologie*, 24: 1-26.
- Hess, A. (1961). The structure of slow and fast extrafusar muscle fibers in the extraocular muscles and their nerve endings in guinea pigs, *J. Cell. Comp. Physiol.* 58: 63-80.
- Hess, A. y Pilar, G. (1963). Slow fibers in the extraocular muscles of the cat. *J. Physiol.*, 169: 780-798.
- Highstein, S.M. (1973). The organization of the vestibulo-oculomotor and trochlear pathways in the rabbit. *Expl. Brain Res.*, 17: 285-300.
- Hightein, S.M. y Baker, R. (1978). Excitatory termination of abducens internuclear neurons on medial rectus motoneurons: relationship to syndrome of internuclear ophthalmoplegia. *J. Neurophysiol.*, 41: 1647-1661.
- Hindenberg, A.A., Gervasoni, J., Krishna, S., Stewart, V., Rosado, M., Lutzky, J., Bhalla, K., Baker, M. y Taub, R.N. (1989). Intracellular distribution and pharmacokinetics of daunorubicin in anthracycline-sensitive and resistant HL-60 cells. *Cancer Res.*, 49: 4607-4614.
- Hoffman, R.O. y Helveston, E.M. (1986). Botulinum in the treatment of adult motility disorders. *Int. Ophthalmol. Clin.*, 26: 241-250.
- Holland, R.L. y Brown, M.C. (1981). Nerve grow in botulinum toxin poisoned muscles. *Neuroscience*, 6: 1167-1179.
- Jankovic, J. y Ford, J. (1983). Blepharospasm and orofacial-cervical dystonia: Clinical and pharmacological findings in 100 patients. *Ann. Neurol.*, 13: 402-411.

- Jankovic, J. (1988). Blepharospasm and oromandibular-laryngeal-cervical dystonia: A controlled trial of botulinum A toxin therapy. *Adv. Neurol.*, 50: 583-591.
- Jannetta, P.J. (1981). Hemifacial spasm. En: *The Cranial Nerves* (M. Samii y P.J. Jannetta, eds.). Springer-Verlag, New York, pp. 484-493.
- Kato, S., Yamamoto, T., Iwasaki, Y., Niizuma, H., Nakamura, T. y Suzuki, J. (1988). Experimental retrograde Adriamycin trigeminal sensory ganglionectomy. *J. Neurosurg.*, 69: 760-765.
- Keizer, K., Kuypers, H.G.J.M., Huisman, A.M. y Dann, O. (1983). Diamidino yellow dihydrochloride (DY.2HCL): A new fluorescent retrograde neuronal tracer which migrates only very slowly out of the cell. *Exp. Brain Res.*, 51: 179-191.
- Konigsmark, B.W. (1970). Methods for the counting of neurons. En: *Contemporary Research Methods in Neuroanatomy* (W.J.H. Nauta y S.O.E. Ebbesson, eds.). Springer-Verlag, Berlin, pp. 313-340.
- Kristensson, K. y Olsson, T. (1978). Uptake and retrograde axonal transport of horseradish peroxidase in botulinum-intoxicated mice. *Brain Res.*, 155: 118-123.
- Kristensson, K. y Olsson, Y. (1971). Retrograde axonal transport of protein. *Brain Res.*, 29: 363-365.
- Kristensson, K., Olsson, Y. y Sjöstrand, J. (1971). Axonal uptake and retrograde transport of exogenous proteins in the hypoglossal nerve. *Brain Res.*, 32: 399-406.
- Kuypers, H.G.J.M., Bentivoglio, M., Catsman-Berrevoets, C.E. y Bharos, A.T. (1980). Double retrograde neuronal labeling through divergent axons, using two fluorescent tracers with the same excitation wavelengths which label different features of the cell. *Exp. Brain Res.*, 40: 383-392.
- Kuypers, H.G.J.M., Bentivoglio, M., Van der Kooy, D. y Catsman-Berrevoets, C.E. (1979). Retrograde transport of bisbenzimidazole and propidium iodide through axons to their parent cell bodies. *Neurosci. Lett.*, 12: 1-7.

- Kuypers, H.G.J.M., Catsman-Berrevoets, C.E. y Padt, R.E. (1977). Retrograde axonal transport of fluorescent substances in the rat's forebrain. *Neurosci. Lett.*, 6: 127-135.
- Labandeira-García, J.L. (1980). Estudio de la localización de las neuronas que controlan la inervación motora y propioceptiva de los músculos extraoculares mediante técnicas de transporte retrógrado y anterógrado de peroxidasa (HRP) y fluorocromos. Tesis Doctoral, Universidad de Santiago de Compostela, España.
- Labandeira-García, J.L. y Gómez-Segade, L.A. (1983). Localización de las motoneuronas que inervan el músculo retractor bulbi del conejo, rata y gato. *Morfología Normal y Patológica*, 1: 169-176.
- Labandeira-García, J.L., Gómez-Segade, L.A. y Suárez-Núñez, J.M. (1983). Localisation of motoneurons supplying the extra-ocular muscles of the rat using horseradish peroxidase and fluorescent double labelling. *J. Anat.*, 137: 247-261.
- Labandeira-García, J.L., Guerra-Seijas, M.J. y Labandeira-García, J.A. (1989). The abducens motor and internuclear neurons in the rabbit: retrograde horseradish peroxidase and double fluorescent labeling. *Brain Res.*, 497: 305-314.
- Labandeira-García, J.L., Guerra-Seijas, M.J., Segade, L.A.G. y Suárez-Núñez, J.M. (1987). Identification of abducens motoneurons, accessory abducens motoneurons, and abducens internuclear neurons in the chick by retrograde transport of horseradish peroxidase. *J. Comp. Neurol.*, 259: 140-149.
- Lambertenghi-Delilieri, G. (1972). Ultrastructural alterations induced in hepatic cell nucleoli by adriamycin. En: *International Symposium on Adriamycin*. (S.K. Carter, A. Di Marco, M. Ghione, I.H. Krakoff y G. Marthe, eds.). Springer, New York. pp. 26-34.
- Lambertenghi-Delilieri, G., Zanon, P.L. y Pozzoli, E.F. (1976). Myocardial injury induced by a single dose of adriamycin: an electron microscopic study. *Tumori*, 62: 517-528.
- Langer, T., Fuchs, A.F., Scudder, C.A. y Chubb, M.C. (1985). Afferents to the flocculus of the cerebellum in the rhesus macaque as revealed by retrograde transport of horseradish peroxidase. *J. Comp. Neurol.*, 235: 1-25.

- Langer, T., Kaneko, C.R.S., Scudder, C.A. y Fuchs, A.F. (1986). Afferents to the abducens nucleus in the monkey and cat. *J. Comp. Neurol.*, 245: 379-400.
- LaVelle, A. y LaVelle, F. (1958). Neuronal swelling and chromatolysis as influenced by the state of cell development. *Am. J. Anat.*, 102: 219-241.
- Lee, J.P. y Elston, J.S. (1988). Botulinum Toxin for Squint - The Moorfields experience. En: *Acta XVII Concilii Europae Strabologicae Associetatis*. (J. Murube, ed.). Madrid, pp. 195-207.
- Leser, O. (1925). On the development of the extra-ocular muscles in some mammals. *Br. J. Ophthalmol.*, 9: 154-161.
- Lieberman, A.R. (1971). The axon reaction: a review of the principle feature of perikaryal responses to axon injury. *Int. Rev. Neurobiol.*, 41: 49-124.
- Loeser, J.D. y Chen, J. (1983). Hemifacial spasm: Treatment by microsurgical facial nerve decompression. *Neurosurgery*, 13: 141-146.
- Magoon, E.H. (1986). Botulinum chemodenervation for strabismus and other disorders. *Int. Ophthalmol. Clin.*, 25: 149-159.
- Magoon, E.H. (1989). Botulin therapy in pediatric ophthalmology. *International Ophthalmology Clinics*, 29: 30-32.
- McCrea, R.A. y Baker, R. (1985). Anatomical connections of the nucleus prepositus of the cats. *J. Comp. Neurol.*, 237: 377-407.
- McCrea, R.A., Baker, R. y Delgado-García, J.M. (1979). Afferent and efferent organization of the prepositus hypoglossi nucleus. En: *Reflex Control of Posture and Movements*. *Prog. Brain Res.*, Vol. 50 (R. Granit y O. Pompeiano, eds.). Elsevier, Amsterdam, pp. 653-665.
- McCrea, R.A., Strassman, A. y Highstein, S.M. (1986). Morphology and physiology of abducens motoneurons and internuclear neurons intracellularly injected with horseradish peroxidase in alert squirrel monkeys. *J. Comp. Neurol.*, 243: 291-308.

- McLoon, L.K., Bauer, G. y Wirtschafter, J.D. (1990). Increased tissue infiltration increases doxorubicin chemomyectomy in orbicularis oculi. *ARVO Abstracts. Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, 31: 43.
- McLoon, L.K., Bauer, G. y Wirtschafter, J.D. (1991). Quantification of muscle loss in the doxorubicin-treated orbicularis oculi of the monkey. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, 32: 1667-1673.
- McLoon, L.K., Ekern, M. y Wirtschafter, J.D. (1992). Verapamil substantially increases the chemomyectomy effect of doxorubicin injected into rabbit or monkey eyelid. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, 33: 3228-3234.
- McLoon, L.K., Kirsch, J.D., Cameron, S. y Wirtschafter, J.D. (1994). Injection of doxorubicin into rabbit eyelid does not result in loss of facial motor neurons. *Brain Res.*, 641: 105-110.
- McLoon, L.K. y LaVelle, A. (1981). Long-term effects of regeneration and prevention of regeneration on nucleolar morphology after facial nerve injury during development. *Exp. Neurol.*, 73: 762-774.
- McLoon, L.K., Ozel, B. y Wirtschafter, J.D. (1995). Cyclosporin protects the eyelid skin from injury after injection of doxorubicin. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, 36: 1433-1440.
- McLoon, L.K. y Wirtschafter, J.D. (1988). Doxorubicin chemomyectomy: Injection of monkey orbicularis oculi results in selective muscle injury. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, 29: 1854-1889.
- McLoon, L.K., Wirtschafter, J.D. y Cameron, J.D. (1993). Muscle loss from doxorubicin injections into the eyelids of a patient with blepharospasm. *Am. J. Ophthalmol.*, 116: 646-648.
- Melling, J., Hambleton, P. and Shone, C.C. (1988). Clostridium botulinum toxins: nature and preparation for clinical use. *Eye*, 2: 16-23.
- Merchenthaler, I. (1991). Neurons with access to the general circulation in the central nervous system of the rat: A retrograde tracing study with Fluoro-Gold. *Neuroscience*, 44: 655-662.

- Merski, J.A., Daskal, Y. y Busch, H. (1976). Effect of adriamycin on the ultrastructure of nucleoli in the heart and liver cells of the rat. *Cancer Res.*, 36: 1580-1584.
- Miller, J.E. (1967). Cellular organization of rhesus extraocular muscle. *Invest. Ophthalmol.*, 6: 18-39.
- Moreno-López, B., De la Cruz, R.R., Dolly, J.O. y Delgado-García, J.M. (1994). Lateral rectus muscle paralysis induced by botulinum toxin: Effects on abducens motoneuron discharge characteristics. En: *Information Processing Underlying Gaze Control*. (J.M. Delgado-García, E. Godaux y P.P. Vidal, eds.). Elsevier Science, Oxford, pp. 31-39.
- Murphy, E.H., Garone, M., Tashayod, D. y Baker, R. (1986). Innervation of extraocular muscles in the rabbit. *J. Comp. Neurol.*, 254: 78-90.
- Murphy, E.H., Spencer, R.F. y Baker, R. (1984). Physiology and morphology of axotomized cat trochlear motoneurons. *Neurosci. Abstr.* 10: 390.
- Nakao, S. y Shiraishi, Y. (1983). Excitatory and inhibitory synaptic inputs from the medial mesodiencephalic junction to vertical eye-movement related motoneurons in the cat oculomotor nucleus. *Neurosci. Lett.*, 42: 125-130.
- Nakao, S. y Shiraishi, Y. (1985). Direct excitatory and inhibitory synaptic inputs from the medial mesodiencephalic junction to motoneurons innervating extraocular oblique muscles in the cat. *Expl. Brain Res.*, 61: 62-72.
- Oda, Y. (1981). The nerve center of the rat extrinsic ocular muscles as studied using horseradish peroxidase. *Okajimas Folia Anat. Jpn.*, 58: 17-42.
- Olmos, J. y Heimer, L. (1980). Double and triple labeling of neurons with fluorescent substances; the study of collateral pathways in the ascending raphe system. *Neurosci. Lett.*, 19: 7-12.
- Olson, H.M., Young, D.M., Prier, D.J., Le Roy, A.F. y Reagan, R.L. (1974). Electrolyte and morphologic alterations of myocardium in adriamycin-treated rabbits. *Am. J. Pathol.*, 77: 439-450.
- Osako, M. y Keltner, J.L. (1991). Botulinum A toxin (Oculinum^R) in ophthalmology. *Surv. Ophthalmol.*, 36: 28-46.

- Palay, S.L., Billings-Gaghardi, S. y Chan-Palay, V. (1974). Neuronal perikarya with dispersed, single ribosomes in the visual cortex of *Macaca mulatta*. *J. Cell. Biol.*, 63: 1074-1089.
- Papoian, T. y Lewis, W. (1990). Adriamycin cardiotoxicity in vivo: Selective alterations in rat cardiac mRNAs. *Am. J. Pathol.*, 136: 1201-1207.
- Pásaro, R., Torres, B. y Delgado-García, J.M. (1985). Morphological effects of Vith nerve section in the kitten as revealed by horseradish peroxidase. *Neurosci. Lett.*, 58: 207-211.
- Patrinely, J.R., Whiting, A.S. y Anderson, R.L. (1988). Local side effects of botulinum toxin injections. *Adv. Neurol.*, 49: 493-500.
- Payne, J.M., Lawes, I.N.C., Proctor, G.B. y Horobin, R.W. (1983). Variation between different samples of SITS with respect to axonal transport and toxicity. *Neurosci. Lett.*, 42: 229-234.
- Peachey, L. (1971). The structure of the extraocular muscle fibers of mammals. En: *The Control of Eye Movements* (P. Bach y Rita, C.C. Collins y J.E. Hyde, eds.). Academic Press, New York, pp. 47.
- Peinado-Ramón, P., Salvador, M., Villegas-Pérez, M.P. y Vidal-Sanz, M. (1996). Effects of axotomy and intraocular administration of NT-4, NT-3, and brain derived neurotrophic factor on the survival of adult rat retinal ganglion cells: A quantitative in vivo study. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, 37: 489-500.
- Pigram, W.J., Fuller W. y Hamilton L.D. (1972). Stereochemistry of intercalation-interaction of daunomycin with DNA. *Nature New Biol.*, 235: 17-19.
- Pinter, M.J., Vanden Noven, S., Muccio, D. y Wallace, N. (1991). Axotomy-like changes in cat motoneuron electrical properties elicited by botulinum toxin depend on the complete elimination of neuromuscular transmission. *J. Neurosci.*, 11: 657-666.
- Porter, J.D., Strebeck, S. y Capra, N.F. (1991). Botulinum-induced changes in monkey eyelid muscle. Comparison with changes seen in extraocular muscle. *Arch. Ophthalmol.*, 109: 396-404.

- Rinaman, L., Milligan, C.E. y Levitt, P. (1991). Persistence of fluoro-gold following degeneration of labelled motoneurons is due to phagocytes by microglia and macrophages. *Neuroscience*, 44: 765-776.
- Saban, R. (1968). Musculature de la tête. En: *Traité de Zoologie* 16, fasc. II. Masson, París, pp. 230-472.
- Sauer, H. y Oertel, W.H. (1994). Progressive degeneration of nigrostriatal dopamine neurons following intrastriatal terminal lesions with 6-hydroxydopamine: A combined retrograde tracing and immunocytochemical study in the rat. *Neuroscience*, 59: 401-415.
- Savino, P.J., Sergott, R.C., Bosley, T.M. y Schatz, N.J. (1985). Hemifacial spasm treatment with botulinum A toxin injection. *Arch. Ophthalmol.*, 103: 1305-1306.
- Schantz, E.J. y Scott, A.B. (1981). Use of cristallyne type A botulinum toxin in medical research. En: *Biomedical Aspects of Botulism*. (G.E. Lewis, ed.). Academic Press, New York, pp. 143-149.
- Schiavo, G., Benfenati, F., Poulain, B., Rossetto, O., Polverino de Laureto, P., DasGupta, B.R. y Montecucco, C. (1992). Tetanus and botulinum-B neurotoxins block neurotransmitter release by proteolytic cleavage of synaptobrevin. *Nature*, 359: 832-835.
- Schmued, L.C. y Fallon, J.H. (1985). Stilbene-Gold: A new fluorescent retrograde axonal tracer with several unique advantages. *Anat. Rec. Abstr.*, 211: 170A.
- Schmued, L.C. y Fallon, J.H. (1986). Fluoro-Gold: A new fluorescent retrograde axonal tracer with numerous unique properties. *Brain Res.*, 377: 147-154.
- Schmued, L.C., Kyriakidis, K., Fallon, J.H. y Ribak, C.E. (1989). Neurons containing retrogradely transported Fluoro-Gold exhibit a variety of lysosomal profiles: a combined brightfield, fluorescence, and electron microscopic study. *J. Neurocytol.*, 18: 333-343.
- Schmued, L.C. y Swanson, L.W. (1982). SITS: a covalently bound fluorescent retrograde tracer that does not appear to be taken up by fibers of passage. *Brain Res.*, 249: 137-141.

- Schwartz, H.S. (1975). DNA breaks in P-288 tumor cells in mice after treatment with daunorubicin and adriamycin. *Res. Commun Chem. Pathol. Pharmacol*, 10: 51.
- Scott, A.B. (1980a). Botulinum toxin injection into extraocular muscles as an alternative to strabismus surgery. *J. Pediatr. Ophthalmol. Strabismus*, 17: 21-25.
- Scott, A.B. (1980b). Botulinum toxin injection into extraocular muscles as an alternative to strabismus surgery. *Ophthalmology*, 87: 1044-1049.
- Scott, A.B. (1981). Botulinum toxin injection of eye muscles to correct strabismus. *Trans. Am. Ophthalmol. Soc.*, 79: 734-770.
- Scott, A.B. (1987). Botulinum treatment for blepharospasm. En: *Ophthalmic Plastic and Reconstructive Surgery, Vol. 1* (B.C. Smith, ed.). C.V. Mosby, St. Louis, pp. 609-613.
- Scott, A.B. (1988). Antitoxin reduced botulinum side effects. *Eye*, 2: 29-32.
- Scott, A.B. (1989a). Clostridial toxin as therapeutic agents. En: *Botulinum Neurotoxin and Tetanus Toxin* (L.L. Simpson, ed). Academic Press, New York, pp. 399-412.
- Scott, A.B. (1989b). Botulinum toxin treatment of strabismus. *Focal Points: Clinical Modules for Ophthalmologists. American Academy of Ophthalmology, San Francisco*, 7: 1-11.
- Scott, A.B., Kennedy, R.A. y Stubbs, H.A. (1985). Botulinum toxin injection as a treatment for blepharospasm. *Arch. Ophthalmol.*, 103: 347-350.
- Scott, A.B., Magoon, E.H., McNeer, K.W. y Stager, D.R. (1990). Botulinum treatment of childhood strabismus. *Ophthalmology*, 97: 1434-1438.
- Scott, A.B., Rosenbaum, A. y Collins, C. (1973). Pharmacologic weakening of extraocular muscles. *Invest. Ophthalmol.*, 12: 924-927.

- Sellés-Navarro, I., Villegas-Pérez, M.P., Salvador-Silva, M., Ruíz-Gómez, J.M. y Vidal-Sanz, M. (1996). Retinal ganglion cell death after different transient periods of pressure-induced ischemia and survival intervals: A quantitative in vivo study. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* (En prensa).
- Sellin, L.C. (1985). The pharmacological mechanism of botulism. *Trends in Pharmacological Science*, 6: 80-82.
- Shaw, M.D. y Alley, K.E. (1981). Generation of the ocular motor nuclei and their cell types in the rabbit. *J. Comp. Neurol.*, 200: 69-82.
- Shaw, M.D., Spencer, R.F. y Baker, R. (1983). Peculiar neuronal organization of the cat trochlear nucleus. *Neurosci. Abstr.*, 9: 1087.
- Simpson, L.L. (1981). The origin, structure, and pharmacological activity of botulinum toxin. *Pharmacol. Rev.*, 33: 155-188.
- Simpson, L.L. (1989). Peripheral actions of botulinum toxins. En: *Botulinum Neurotoxin and Tetanus Toxin* (L.L. Simpson, ed.). Academic Press, San Diego, pp. 153-178.
- Snyder-Keller, A.M. (1988). Fluoro-Gold reveals patches of striatal neurons during development. *Neurosci. Lett.*, 91: 136-141.
- Sonneveld, P., Wassenaar, H.A. y Nooter, K. (1984). Long persistence of doxorubicin in human skin after extravasation. *Cancer Treat. Rep.*, 68: 895-896.
- Spencer, R.F. y McNeer, K.W. (1987). Botulinum toxin paralysis of adult monkey extraocular muscle. Structural alteration in orbital singly innervated muscle fibers. *Arch. Ophthalmol.*, 105: 1703-1711.
- Stanley, E.F. y Drachman, D.B. (1983). Botulinum toxin blocks quantal but not non-quantal release of ACh at the neuromuscular junction. *Brain Research*, 261: 172-175.
- Steiger, H.J. y Büttner-Ennever, J.A. (1978). Relationship between motoneurons and internuclear neurons in the abducens nucleus: a double retrograde study in the cat. *Brain Res.*, 148: 181-188.

- Steiger, H.J. y Büttner-Ennever, J.A. (1979). Oculomotor nucleus afferents in the monkey demonstrated with horseradish peroxidase. *Brain Res.*, 160: 1-15.
- Sumner, B.E.H. (1975a). A quantitative analysis of the response of presynaptic boutons to postsynaptic motor neuron axotomy. *Exp. Neurol.*, 46: 605-615.
- Sumner, B.E.H. (1975b). A quantitative analysis of boutons with different types of synapse in normal and injured hypoglossal nuclei. *Exp. Neurol.*, 49: 406-417.
- Sumner, B.E.H. (1977). Ultrastructural responses of the hypoglossal nucleus to the presence in the tongue of botulinum toxin, a quantitative study. *Exp. Brain Res.*, 30: 313-321.
- Sumner, B.E.H. y Sutherland, F.I. (1973). Quantitative electron microscopy on the injured hypoglossal nucleus in the rat. *J. Neurocytol.*, 2: 315-328.
- Thanos, S. (1991a). Specific transcellular carbocyanine-labelling of rat retinal microglia during injury-induced neuronal degeneration. *Neurosci. Lett.*, 127: 108-112.
- Thanos, S. (1991b). The relationship of microglial cells to dying neurons during natural neuronal cell death and axotomy-induced degeneration of the rat retina. *Eur. J. Neurosci.*, 3: 1189-1207.
- Tarlov, E. y Tarlov, S.R. (1971). The representation of extraocular muscles in the oculomotor nuclei: Experimental studies in the cat. *Brain Research*, 113: 582-588.
- Uchino, Y. y Hirai, N. (1984). Axon collaterals of anterior semicircular canal-activated vestibular neurons and their coactivation of extraocular and neck motoneurons in the cat. *Neurosci. Res.*, 1: 309-325.
- Van der Kooy, D., Kuypers, H.G.J.M. y Catsman-Berrevoets, C. (1978). Single mammillary body cells with divergent axon collaterals. Demonstration by a simple fluorescent retrograde double labeling technique in the rat. *Brain Res.*, 158: 189-196.
- Vidal-Sanz, M., Villegas-Pérez, M.P., Bray, G.M. y Aguayo, A.J. (1988). Persistent retrograde labelling of adult rat retinal ganglion cells with the carbocyanine dye dil. *Exp. Neurol.*, 102: 92-101.



- Vig, B.K. (1971). Chromosome aberrations induced in human leukocytes by the antileukemic antibiotic adriamycin. *Cancer Res.*, 31: 32-38.
- Villegas-Pérez, M.P., Vidal-Sanz, M., Rasminsky, M., Bray, G.M. y Aguayo, A.J. (1993). Rapid and protracted phases of retinal ganglion cell loss follow axotomy in the optic nerve of adult rats. *J. Neurobiol.*, 24: 23-36.
- Von Monakov, C. (1905). *Gehirnpathologie*. Vienna: Alfred Holder.
- Warwick, R. (1951). A study of retrograde degeneration in the oculomotor nucleus of the rhesus monkey. *Brain*, 73: 532-543.
- Warwick, R. (1953). Representation of extraocular muscles in the oculomotor nuclei of the monkey. *J. Comp. Neurol.*, 98: 449-504.
- Watson, W.E. (1965). An autoradiographic study of the incorporation of nucleic-acid precursors by neurones and glia during nerve regeneration. *J. Physiol.*, 180: 741-753.
- Watson, W.E. (1968). Observations on the nucleolar and total cell body nucleic-acid of injured nerve cells. *J. Physiol.*, 196: 655-676.
- Watson, W.E. (1969). The response of motor neurones to intramuscular injection of botulinum toxin. *J. Physiol.*, 202: 611-630.
- Weiss, C. y Disterhoft, J.F. (1985). Connections of the rabbit abducens nucleus. *Brain Res.*, 326: 172-178.
- Wellhöner, H.H. (1989). Clostridial toxins and the central nervous system: Studies on in situ tissues. En: *Botulinum Neurotoxin And Tetanus Toxin* (L.L. Simpson, ed.). Academic Press, San Diego, pp. 231-254.
- Wiley R.G., Blessing, W.W. y Reis D.J. (1982). Suicide transport: destruction of neurons by retrograde transport of ricin, abrin and modeccin. *Science*, 216: 889-890.
- Wirtschafter, J.D. (1991). Clinical doxorubicin chemomyectomy: An experimental treatment for benign essential blepharospasm and hemifacial spasm. *Ophthalmology*, 98: 357-366.

- Wirtschafter, J.D. (1994). Chemomyectomy of the orbicularis oculi muscles for the treatment of localized hemifacial spasm. *J. Neuro-Ophthalmol.*, 14: 199-204.
- Yamamoto, T., Iwasaki, Y. y Konno, H. (1983). Retrograde axoplasmic transport of toxic lectins is useful for transganglionic tracings of the peripheral nerve. *Brain Res.*, 274: 325-328.
- Yamamoto, T., Iwasaki, Y. y Konno, H. (1984a). Experimental sensory ganglionectomy by way of suicide axoplasmic transport. *J. Neurosurg.*, 60: 108-114.
- Yamamoto, T., Iwasaki, Y. y Konno, H. (1984b). Retrograde axoplasmic transport of Adriamycin: an experimental form of motor neuron disease?. *Neurology*, 34: 1299-1304.
- Young, D.M. (1975). Pathologic effect of adriamycin (NSC 123127) in experimental systems. *Cancer Chemother Rep.*, 6: 159-175.