

Actividad de motoneuronas axotomizadas del núcleo motor ocular externo en el gato despierto *

J. Ribas, R. Serra y J. M. Delgado-García **

Departamento de Fisiología
Facultad de Medicina
Universidad de Sevilla

(Recibido el 22 de junio de 1982)

J. RIBAS, R. SERRA and J. M. DELGADO-GARCIA. *Activity of Axotomized Abducens Motoneurons in the Alert Cat*. Rev. esp. Fisiol., 38, 303-310. 1982.

The spontaneous and the visual and vestibular induced activity of axotomized abducens motoneurons (ABD Mns) has been recorded in alert cats. Axotomy was carried out peripherally in the ocular orbit. ABD Mns were identified by their antidromic activation from the VIth nerve. Control Mns showed a clear relationship with eye position and velocity in the horizontal plane, whereas axotomized Mns showed a remarkable variability in their antidromic activation, a rapid fatigability during eye fixations and a decreased sensibility to eye velocity. Occasionally, axotomized Mns fired a short burst of activity before saccades in the off-direction. Functional involvements of described findings are discussed.

A pesar de la importancia experimental y clínica, la información disponible acerca de las propiedades funcionales de neuronas axotomizadas en el animal despierto es escasa (1, 6). Si bien existen numerosos estudios acerca de las modificaciones electrofisiológicas típicas de motoneuronas en proceso de cromatolisis (7, 9, 11, 12), al estar éstos realizados en animales anestesiados no es posible de modo concluyente predecir la actividad que di-

chas neuronas pueden tener en el animal despierto.

El núcleo del motor ocular externo (nMOE) es un modelo excelente para el estudio de la respuesta neuronal a la lesión en el animal despierto ya que, por una parte, se conoce bastante bien su organización y aferencias (2, 3, 13) y, por otra, se ha estudiado en detalle la fisiología de sus motoneuronas (Mns) en preparaciones tanto agudas como crónicas (3, 6, 8).

El objeto de este trabajo fue el estudio, en el gato despierto, de la actividad espontánea e inducida por estimulación visual y/o vestibular de Mns del nMOE desde el momento de la sección de sus axones hasta la reinervación y recuperación completa de la motilidad ocular.

* Trabajo realizado con fondos de la Comisión Asesora de Investigación Científica y Técnica.

** A quien debe dirigirse la correspondencia.

Dado que estas Mns codifican tanto la posición del globo ocular en la órbita, como la velocidad de sus desplazamientos, se prestó especial atención a la determinación de si las Mns axotomizadas mantienen dicha información (posición y velocidad ocular) o bien, si la pierden de modo transitorio o permanente. Con objeto de aumentar la significación experimental de los resultados obtenidos, sólo se consideraron como Mns o interneuronas (Ints) del nMOE aquellas neuronas activadas antidrómicamente desde el nervio del MOE homolateral o desde el motor ocular común contralateral (MOCc), respectivamente (5).

Material y métodos

Se utilizaron 4 gatos con pesos comprendidos entre 2 y 3,5 kg. A cada animal se le implantaron bajo anestesia (35 mg/kg pentobarbital sódico, i.p.) 3 electrodos para el registro del EOG en el plano horizontal y 2 electrodos de estimulación, uno en el nervio del MOE homolateral al área de registro y otro en el núcleo del MOCc. Al mismo tiempo se le implantó un sistema de inmovilización para facilitar el registro crónico de la actividad neuronal (4). El nMOE se abordó a través del cerebelo intacto (1). Los registros se realizaron con micropipetas llenas de ClNa 2 M (2-4 Mohmios de impedancia), mediante un preamplificador NEX-1 (Biomedical Engineering Co.) de alta impedancia de entrada (10^{12} ohmios). La actividad eléctrica registrada se amplificó y filtró como se ha descrito en otro lugar (15). La axotomía se realizó en la órbita ocular, aproximadamente a 0,5 mm de la inserción muscular del nervio del MOE.

Las sesiones de registro se realizaron en días alternos, desde 10 días antes hasta 60 días después de la axotomía. Para la activación antidrómica de las neuronas del nMOE se utilizaron pulsos catódicos

de 50-70 μ s de duración y con intensidades entre 50 y 500 μ A. Se registraron un total de 35 Mns control y 65 Mns axotomizadas. La actividad de las neuronas identificadas, así como el EOG y la estimulación vestibular se grabaron en una cinta magnética instrumental de 4 canales (Hewlett Packard 3600). La estimulación vestibular consistió en la rotación manual ($\pm 15^\circ$) de la mesa de registro en el plano horizontal (15). Una vez concluidos los experimentos se comprobó histológicamente la localización de los electrodos de estimulación, así como la correcta reinervación del músculo recto externo previamente denervado (15).

Resultados

En la figura 1 se muestran algunas de las características diferenciales entre Mns controles y axotomizadas. Para las Mns controles fue fácil encontrar el estímulo umbral capaz de activarlas antidrómicamente (fig. 1A). Cuando se aplicaron estímulos supraumbrales dichas Mns se activaron en todos los casos, independientemente del estado de alerta del animal o de la posición del ojo en la órbita (fig. 1B).

Por el contrario, la activación antidrómica de Mns axotomizadas dependió en gran parte de la posición del ojo en la órbita y del grado de activación del sistema oculomotor (6). Incluso con estímulos de intensidad doble de la umbral, las Mns axotomizadas no se activaron en todos los casos. En la figura 1E se puede observar cómo la activación antidrómica de una Mn axotomizada, en presencia de estimulación vestibular, produjo la aparición de potenciales de acción en ésta, mientras que en la figura 1D se muestra cómo la misma estimulación antidrómica, sin estimulación vestibular simultánea, no produjo efecto alguno (fig. 3B). Como se muestra en la figura 1C y E, al aplicarse pares de pulsos, las Mns control ($n = 20$) mostraron un intervalo mínimo medio de

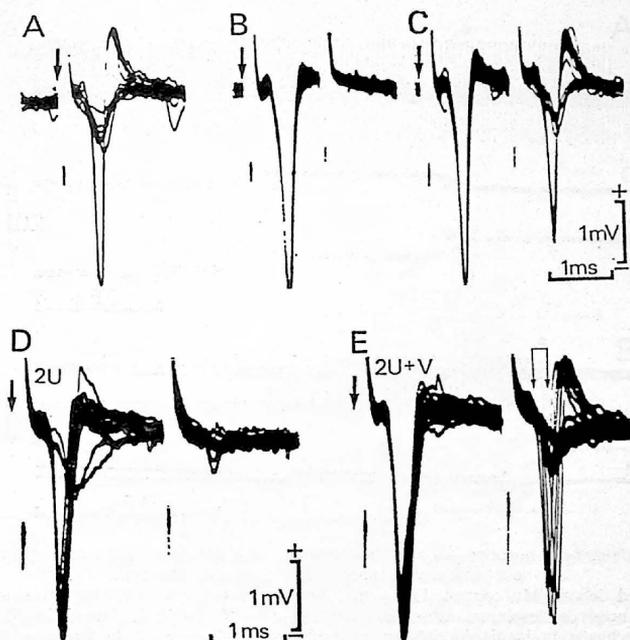


Fig. 1. Activación antidrómica de motoneuronas (Mns) normales (A-C) y axotomizadas (D-E) del núcleo motor ocular externo (lado izquierdo).

A. Respuesta todo o nada de una Mn normal a la estimulación umbral. B y C. Determinación del intervalo mínimo de activación de la misma Mn. Gato #3. Intensidad de estimulación doble de la umbral. D. Activación antidrómica de una Mn, 9 días después de la axotomía. Nótese que el estímulo (doble de la intensidad umbral, 2U) no activa la Mn en todas las ocasiones. E. La presencia de estimulación vestibular (rampas hacia la derecha de 30° de amplitud a 0,2 Hz) hace que el mismo estímulo empleado en D sea capaz ahora de activar la Mn en todos los casos tras el primer pulso y de hacerlo eventualmente durante el segundo pulso (flechas unidas). Las flechas hacia abajo indican el inicio de la estimulación. Calibración y polaridad como se indican para A-C y D-E.

$1,29 \pm 0,05$ (E.S.) ms, significativamente ($p < 0,05$) inferior al de las Mns axotomizadas ($1,53 \pm 0,04$ ms; $n = 20$), indicando un mayor período refractario de estas últimas.

Otro aspecto característico de las Mns axotomizadas del nMOE fue la variabilidad de su latencia de activación a la es-

timulación antidrómica (fig. 1 E). Dicho efecto, presente en prácticamente todas las Mns axotomizadas registradas, no pudo detectarse en Mns normales, salvo cuando se utilizaron frecuencias de activación muy altas (más de 30 Hz).

La actividad de las Mns controles del MOE en el gato despierto se relacionó

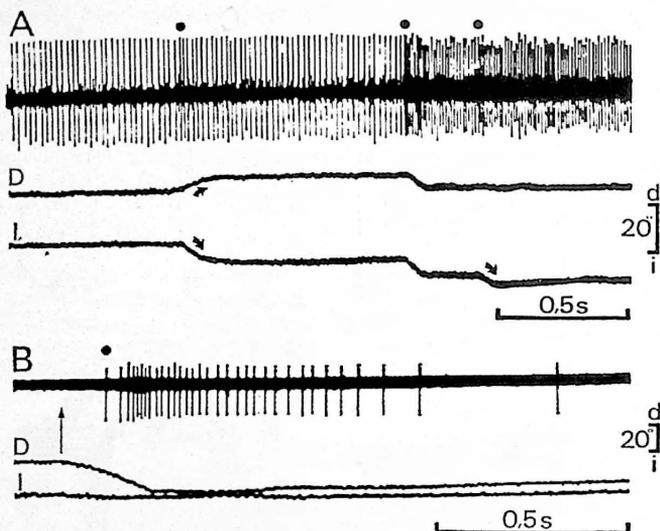


Fig. 2. Actividad de motoneuronas (Mns) normales y axotomizadas del motor ocular externo durante movimientos oculares espontáneos.

A. Actividad de una Mn control. Los puntos indican incrementos de frecuencias correspondientes a sucesivos desplazamientos del ojo izquierdo (I) hacia la izquierda (i). Las dos primeras flechas a la izquierda señalan un movimiento divergente; la flecha a la derecha señala un movimiento monocular. B. Actividad de una Mn 11 días después de la axotomía. La flecha indica el inicio del movimiento del ojo derecho (D) y el punto, el inicio de la actividad neuronal. Nótese que no se detecta movimiento alguno en el ojo izquierdo (I). Calibraciones como se indica; d: movimiento a la derecha.

tanto con la posición como con la velocidad del ojo homolateral en el plano horizontal, aunque su sensibilidad a ambos parámetros fue diferente de célula a célula. En la figura 2 se muestra un ejemplo de la actividad de una Mn normal (A) y de una Mn axotomizada (B) durante distintas fijaciones y movimientos oculares. Aunque ambas Mns se mostraron más relacionadas con la posición que con la velocidad del movimiento ocular, puede observarse cómo la Mn normal mantuvo de forma constante una frecuencia de disparo determinada para cada posición del ojo homolateral. Por el contra-

rio, la Mn axotomizada presentó una menor sensibilidad al movimiento ocular y sobre todo una disminución exponencial de la actividad tónica, iniciada tras la consecución de una nueva posición del ojo en la órbita en la dirección de activación. Dicha incapacidad para mantener una actividad tónica durante fijaciones oculares fue común, prácticamente, a todas las Mns axotomizadas registradas.

En la figura 3 se compara la actividad de otras 2 Mns del nMOE, una normal (A), sensible de modo preferente a los cambios de posición, y otra axotomizada (B), con una sensibilidad muy dismi-

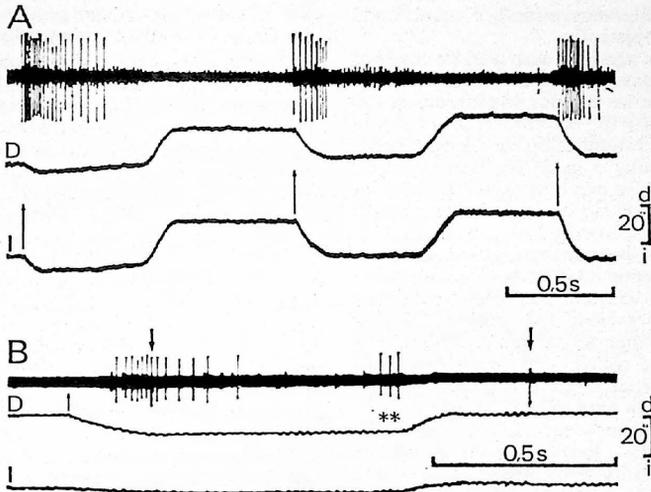


Fig. 3. Actividad de dos motoneuronas (Mns), una normal y otra axotomizada durante movimientos oculares espontáneos.

A. Actividad de una Mn normal. Nótese la escasa sensibilidad de esta Mn a la posición mantenida del ojo izquierdo. B. Actividad de una Mn 8 días después de su axotomía. Nótese la latencia en el inicio de la actividad neuronal (flecha hacia arriba), así como la caída exponencial ($y = 65,8 \exp -2,38 X$; $r = 0,93$) de su frecuencia de disparo durante la fijación del globo ocular. Los dos asteriscos señalan un pequeño brote de actividad previo al inicio de un movimiento sacádico en la dirección de inactivación. Las dos flechas hacia abajo indican el estímulo antidrómico. Calibración como se indica; d: movimiento ocular hacia la derecha; i: movimiento ocular hacia la izquierda.

nuida tanto a la posición como a la velocidad ocular. En B se presentan también otros dos rasgos mostrados frecuentemente por las Mns axotomizadas. El primero es la aparición de un breve brote de potenciales de acción, previo al inicio de un movimiento sacádico en la dirección de inactivación. El segundo consiste en que el estímulo antidrómico presente a lo largo del registro (1 Hz), sólo activó la Mn axotomizada cuando el ojo se situó hacia la izquierda, o sea, en la dirección de activación; mientras que cuando el ojo se desplazó hacia la derecha, dirección de

inactivación, el estímulo por sí solo fue incapaz de activar dicha Mn (fig. 1).

En general, las Mns axotomizadas mostraron características funcionales similares a las señaladas en relación con las figuras 2 y 3. Algunas Mns axotomizadas ($n = 10$) mostraron pequeños brotes de actividad sin relación con ningún movimiento ocular en el plano horizontal (no ilustrado). Tales brotes se pueden atribuir tanto a retracciones del globo ocular, como a movimientos verticales sin componente horizontal. En cualquier caso, ninguna de

estas dos hipótesis pudo ser cuantificada de forma objetiva.

Por otra parte, la actividad de las Mns axotomizadas durante la estimulación sinusoidal de los canales semicirculares horizontales ($\pm 15^\circ$ a 0,2-1 Hz), así como durante la estimulación visual optocinética, fue similar a la de las Mns controles excepto por su menor sensibilidad a la posición y velocidad ocular ya indicadas. El incremento de umbral de respuesta y la incapacidad para mantener una actividad tónica durante las fijaciones se mantuvo en las Mns axotomizadas incluso después de la reinervación. Tal como se ha descrito previamente, la reinervación y la consiguiente recuperación de la motilidad ocular ocurrieron entre los 20 y 30 días después de la axotomía (1, 4, 6).

En los mismos experimentos se registraron 20 Ints localizadas en el nMOE (5). Dichas Ints se identificaron mediante su activación antidrómica desde el MOcc. Ninguna de las Ints registradas durante los 60 días siguientes a la axotomía presentó actividad distinta a la de las Ints controles, a pesar de que dichas células reciben idénticas aferencias que las Mns del mismo nMOE (1, 5).

Discusión

Mediante registros intracelulares realizados en gatos anestesiados, se ha comprobado que la axotomía distal de Mns del nMOE produce una disminución de la excitabilidad del segmento inicial (1) similar a la que ocurre en Mns espinales (7, 9). Por el contrario, las Mns del nMOE no presentan el aumento de excitabilidad de las dendritas, ni los potenciales dendríticos activos típicos de las Mns espinales en respuesta a la axotomía (1, 11, 12). Ambos hechos permiten explicar la dificultad de la activación antidrómica en el animal despierto de Mns axotomizadas, así como su dependencia de la facilita-

ción sináptica procedentes de estímulos visuales y vestibulares adecuados (15).

Dado que la excitabilidad axónica de las Mns axotomizadas no se modifica sensiblemente (1, 6, 15), un descenso de la excitabilidad en el segmento inicial explica la necesidad de sumar a la onda M potenciales propagados pasivamente desde las dendritas, para alcanzar el umbral de despolarización. Esto aclararía, por otra parte, la variabilidad en la activación antidrómica típica de las Mns axotomizadas del nMOE (5, 6, 15). Un ejemplo concluyente de la dependencia de facilitación sináptica de las Mns axotomizadas para ser invadidas antidrómicamente es el mostrado en la figura 3 B, donde puede observarse cómo un estímulo antidrómico activa a una Mn axotomizada cuando el ojo ocupa una posición excéntrica en la órbita en la dirección de activación (15). Este hecho no ocurre en Mns e Ints normales del nMOE (5 y DELGADO-GARCÍA *et al.*, en preparación).

La disminución de la excitabilidad del segmento inicial en Mns axotomizadas del nMOE, unida a la falta de aumento en la excitabilidad de las dendritas distales, o a la no aparición de potenciales de acción dendríticos (1), permite explicar en parte el alto umbral de dichas células durante movimientos sacádicos en la dirección de activación, así como su rápida fatiga durante fijaciones oculares.

En la figura 1 A-C y E se observa la desaparición del segundo pico positivo, correspondiente a la invasión de las dendritas, tras el aumento de la intensidad del estímulo. Dicha desaparición se debe, probablemente, a la activación simultánea de otra Mn de mayor umbral situada más lejana al electrodo de registro, cuyo pico negativo, correspondiente a la invasión del espacio IS-SD, coincide en el tiempo con el pico positivo de la Mn más próxima al electrodo de registro. En la figura 1 A se observa el disparo de una pequeña espiga que pudiera ser la que, al

aumentar la intensidad del estímulo (registros ilustrados en la fig. 1 B, C), se activa antidrómicamente con las características señaladas. En cualquier caso, un registro extracelular no es suficiente para confirmar categóricamente la explicación apuntada (1, 7, 8).

Un hecho más difícil de explicar es la aparición de brotes de actividad, precediendo el inicio de movimientos sacádicos espontáneos en la dirección de inactivación. Tal hecho indica, probablemente, la pérdida de señales inhibitorias normalmente presentes en el soma y en las dendritas proximales de las Mns del nMOE. Existen evidencias morfológicas y electrofisiológicas (1, 5) de la inactivación de la proyección vestibular inhibitoria procedente del canal semicircular horizontal homolateral. Un hecho similar puede ocurrir con las proyecciones de las neuronas reticulares inhibitorias (10), que se caracterizan por producir brotes de actividad previos a la iniciación de movimientos sacádicos voluntarios en la dirección de inactivación. El hecho de que el efecto señalado no se ponga también de manifiesto durante movimientos compensatorios en el reflejo vestibulo-ocular, puede deberse a que la inhibición de origen vestibular tiene un curso más lento y aplazado, por lo que su desaparición produce un efecto poco intenso en una Mn con un nivel de excitabilidad disminuido (BAKER *et al.*, en preparación).

Es sorprendente el hecho de que en ninguno de los animales intervenidos se detectasen movimientos del ojo en el que se realizó la axotomía, hasta al menos 20-30 días después de ésta. Este fenómeno puede deberse a las características del sistema de registro (EOG), ya que con sistemas electromagnéticos de detección del movimiento ocular, se ha comprobado que el ojo en que se realiza la axotomía comienza a moverse incluso un día después de ésta (6).

Resumen

Se registra en el gato despierto la actividad espontánea y de origen visual y vestibular de motoneuronas (Mns) normales y axotomizadas del núcleo motor ocular externo (nMOE). La axotomía se realiza a nivel distal, en la órbita. Las Mns se identifican mediante su activación antidrómica desde el nervio del MOE. Las Mns controles muestran una clara relación con la velocidad y la posición del ojo homolateral en el plano horizontal. Las Mns axotomizadas muestran una destacable variabilidad en su activación antidrómica, una rápida fatiga durante las fijaciones oculares y una menor sensibilidad a los movimientos oculares. En algunos casos las Mns muestran brotes de actividad previos al inicio de movimientos sacádicos en la dirección de inactivación. Se discuten las implicaciones funcionales de los hallazgos mencionados.

Bibliografía

1. BAKER, R., DELGADO-GARCÍA, J. M. y MCCREA, R.: En «Lesion-Induced Neuronal Plasticity in Sensorimotor Systems» (H. Flohr y W. Precht, eds.). Springer-Verlag, Berlín, 1981, pp. 51-63.
2. BAKER, R., MANO, N. y SHIMAZU, H.: *Brain Res.*, 15, 573-576, 1976.
3. BAKER, R. y MCCREA, R.: En «Integration in the nervous system» (V. Wilson y A. Asanuma, eds.). Igakaku Shoin Ltd., Tokio, 1979, pp. 97-121.
4. DELGADO-GARCÍA, J. M., BAKER, R., ALLEY, K. y MCCREA, R.: *The Society for Neuroscience Meeting*, 1978.
5. DELGADO-GARCÍA, J. M., BAKER, R. y HIGHSTEIN, S. M.: En «Control of gaze by brain stem neurons» (R. Baker y A. Bertoz, eds.). Elsevier, Amsterdam, 1977, pp. 291-300.
6. DELGADO-GARCÍA, J. M., SERRA, R., RIBAS, J. y BAKER, R.: *Soc. Neurosci. Abstr.*, 7, 205-206, 1981.
7. ECCLES, J. C., LIBET, B. y YOUNG, R. R.: *J. Physiol.*, 143, 11-40, 1958.
8. GRANTYIN, R. y GRANTYIN, A.: *Exp. Brain Res.*, 31, 249-274, 1978.

9. GUSTAFSSON, B.: *J. Physiol.*, 293, 197-215, 1979.
10. HIKOSAKA, O., IGUSA, Y., NAKAO, S. y SHIMAZU, H.: *Exp. Brain Res.*, 33, 337-352, 1958.
11. KUNO, M. y LLINAS, R.: *J. Physiol.*, 210, 807-821, 1970.
12. KUNO, M. y LLINAS, R.: *J. Physiol.*, 210, 823-838, 1970.
13. SCHWINDT, P. C., RITCHER, A. y PRETCH, W.: *Brain Res.*, 60, 259-262, 1973.
14. SERRA, R. y DELGADO-GARCÍA, J. M.: *Rev. esp. Fisiol.*, 36, 457-462, 1980.
15. SERRA, R., RIBAS, J. y DELGADO-GARCÍA, J. M.: *Rev. esp. Fisiol.*, 38, 295-302, 1982.
16. VAN GISBERGEN, J. A. M., ROBINSON, D. A. y GIELEN, S.: *J. Neurophysiol.*, 45, 417-442, 1981.