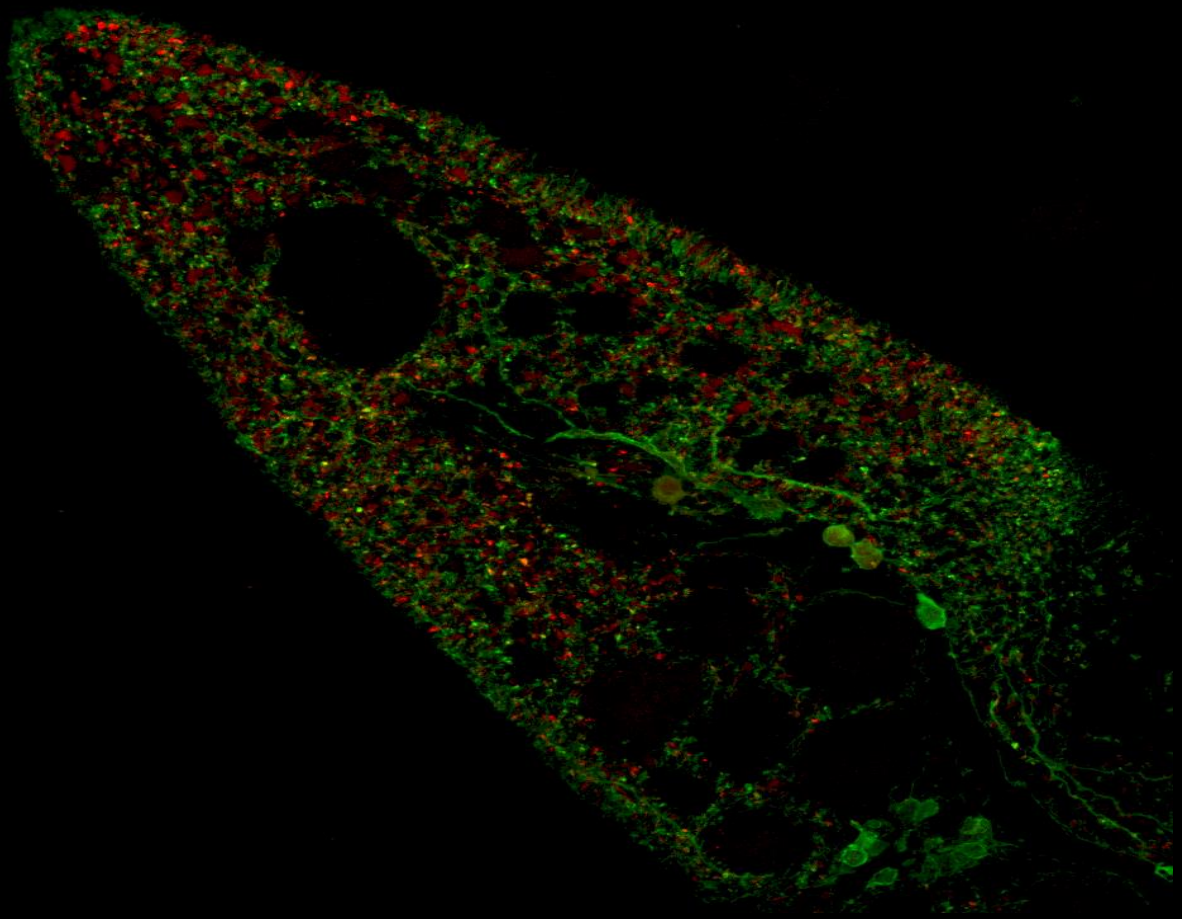


**CAMBIOS EN LA EXPRESIÓN DE NEUROTRANSMISORES
INHIBIDORES EN RESPUESTA A LA LESIÓN Y DURANTE LA
REGENERACIÓN ESPINAL EN LA LAMPREA DE MAR**



Tesis Doctoral

SILVIA M. VALLE MAROTO

Santiago de Compostela, 2017



Universidad de Santiago de Compostela
DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA FUNCIONAL
FACULTAD DE BIOLOGÍA
PROGRAMA DE DOCTORADO EN NEUROCIENCIA
(UNIVERSIDAD DE VIGO, UNIVERSIDAD DE SANTIAGO DE
COMPOSTELA Y UNIVERSIDAD DE A CORUÑA)

Cambios en neurotransmisores inhibidores durante regeneración espinal en lampreas

MEMORIA

Que para optar al Grado de Doctor presenta

SILVIA M. VALLE MAROTO

Santiago de Compostela, 2017





MARÍA CELINA RODICIO RODICIO, CATEDRÁTICA DE BIOLOGÍA CELULAR
DEL DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA CELULAR Y ECOLOGÍA DE LA
UNIVERSIDAD DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Y

BLANCA FERNÁNDEZ LÓPEZ, INVESTIGADORA POSTDOCTORAL EN EL
INSTITUTE OF BIOTECHNOLOGY DE LA UNIVERSITY OF HELSINKI

CERTIFICAN:

Que la presente memoria titulada “Cambios en la expresión de neurotransmisores inhibidores en respuesta a la lesión y durante la regeneración espinal en la lamprea de mar”, que para optar al Grado de Doctor presenta Dña. SILVIA M. VALLE MAROTO, ha sido realizada bajo su dirección, y considerando que constituye trabajo de TESIS DOCTORAL, autorizan su presentación a la Comisión Académica correspondiente.

Y para que así conste expide el presente certificado en Santiago de Compostela, a 27 de febrero de 2017

La Doctoranda

Las Directoras de Tesis

Silvia M. Valle Maroto

M. Celina Rodicio Rodicio

Blanca Fernández López

La investigación realizada ha sido financiada con los siguientes proyectos:

Estudio Inmunohistoquímico de los sistemas aminoacídrgicos durante el desarrollo del sistema nervioso central de la lamprea de mar.

Referencia BFU2007-61056

Financiado por el Ministerio de Ciencia y Tecnología y fondos FEDER.

Consolidación e Estruturación de Unidades de Investigación Competitivas GI-1256

Referencias INCITE09ENA200036ES y GPC2014/030

Financiados por la Xunta de Galicia.

Estudio de los cambios en los sistemas de neurotransmisores durante la regeneración espinal en lampreas.

Referencia BFU2010-17174

Financiado por el Ministerio de Ciencia y Tecnología y fondos FEDER.





Me gustaría comenzar estas líneas poniendo en valor el trabajo de todas las personas que se dedican a la búsqueda del conocimiento, cualquiera que sea su función dentro de esta. Considero que sólo desde el conocimiento se pueden desarrollar las personas y como consecuencia la sociedad.

Mis primeros agradecimientos van dirigidos hacia mis directoras, M. Celina Rodicio Rodicio y Blanca Fernández López. En primer lugar, Celina, gracias por darme la oportunidad de realizar los estudios de posgrado, gracias por aceptarme en tu grupo de investigación y por facilitarme poder terminar este proyecto. Blanca, amiga, sin ti nunca podría haber terminado este trabajo. Fuiste la primera persona que conocí en este viaje y has terminado siendo mi guía.

Gracias a mis compañeros de laboratorio Antón, Dani S., Dani R., Pablo, Blanca y Maru, buena amiga durante el tiempo que viví en Santiago y que ocupó un puesto importantísimo en mis principios en el laboratorio y que lo va a ocupar en el final de este trabajo. Me hubiera gustado compartir más tiempo con vosotros, pero las circunstancias no me lo permitieron, sin embargo haya sido éste mayor o menor, siempre ha sido un placer y a pesar de la distancia, os considero mis compañeros. Aprovechando este momento para agradecer toda la ayuda que me habéis brindado.

Gracias a mis amigas y amigos, siempre pendientes de mi progreso, ofreciéndome ayuda técnica, alojamiento o simplemente aguantando mis monólogos interminables sobre la tesis y las lampreas. Y sobre todo gracias por lo bien que nos lo hemos pasado, nos lo pasamos y, aunque intentemos remediarlo, lo pasaremos...

Los últimos agradecimientos y más importantes son para mi familia. Por apoyarme no sólo durante este proceso, sino durante toda la vida y en todo lo que concierne a la misma, da igual lo que pasé porque sé que estáis a mi lado.

Esta tesis está dedicada a mi sobrina Ani porque ha crecido viéndome estudiar lampreas sin comprender muy bien lo que hacía y que tras años y años de trabajo me ayudado a darle las últimas pinceladas. No se puede querer más.



CONTENIDOS





INTRODUCCIÓN GENERAL.....	11
Lesión medular.....	13
La lamprea como modelo en neurobiología y regeneración.....	13
La médula espinal en la lamprea.....	17
Sistema reticuloespinal de la lamprea.....	19
El circuito locomotor en lampreas.....	22
Neurotransmisores inhibidores.....	23
Sistema glicinérgico y GABAérgico.....	23
Neurotransmisores inhibidores en el sistema nervioso central lamprea.....	24
Respuesta a la lesión y papel durante la regeneración de los sistemas inhibidores en el sistema nervioso central.....	26
JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS.....	29
MATERIAL Y MÉTODOS.....	33
Declaración ética.....	35
Individuos.....	35
Cirugía.....	36
Trazado retrógrado.....	36
Procesamiento del tejido.....	37
Inmunofluorescencia.....	37
Anticuerpos.....	37
Adquisición y análisis de imágenes.....	39
Medidas y cuantificaciones.....	39
Análisis estadísticos.....	40
Terminología.....	41
ABREVIATURAS.....	43
RESULTADOS.....	47
Proyecciones rombencefálicas inhibitoras descendentes en larvas de lamprea de mar.....	49
Consideraciones metodológicas.....	49
Organización general de las proyecciones rombencefálicas descendentes.....	49
Núcleo rombencefálico reticular anterior (ARRN).....	50
Núcleo rombencefálico reticular medial (MRRN).....	50
Núcleo rombencefálico reticular posterior (PRRN).....	51
Figuras.....	52
Cambios en los sistemas de neurotransmisores inhibidores en la médula espinal de la lamprea de mar durante la regeneración.....	61
Respuesta neuronal y astrocítica inmediatamente después de la lesión.....	61
Respuesta neuronal y astrocítica durante la primera semana después de la lesión.....	62
Figuras.....	64
Cambios en los sistemas de neurotransmisores inhibidores en la médula espinal de la lamprea de mar durante la regeneración.....	77

Inmuroreactividad de Glicina y GABA en la médula espinal.....	77
Cambios cuantitativos en las células glicinérgicas y GABAérgicas durante la regeneración de la médula espinal.....	77
Cambios cuantitativos en las fibras glicinérgicas y GABAérgicas durante la regeneración de la médula espinal.....	79
Células doblemente marcadas con Glicina o GABA y trazador en la zona adyacente a la lesión las 1ª y 2ª semanas después de la misma.....	80
Figuras.....	82
DISCUSIÓN.....	105
Proyecciones Rombencefálicas Inhibidoras Descendientes en larvas de Lamprea de mar....	107
Células reticuloespinales rombencefálicas inhibitoras.....	107
Comparación con otros vertebrados.....	108
Significado de la colocalización de dos neurotransmisores inhibitoras “rápidos” en neuronas reticuloespinales.....	109
Consideraciones funcionales.....	109
Cambios en los sistemas de neurotransmisores inhibitoras en la médula espinal de la lamprea de mar durante la regeneración.....	111
Liberación de neurotransmisores aminoacídérgicos inhibitoras por las neuronas y su recaptación por los astrocitos.....	111
Expresión sostenida de GABA en las células CSFc.....	112
Acumulación de neurotransmisores inhibitoras alrededor de los axones reticuloespinales descendentes identificables.....	113
Cambios en los sistemas de neurotransmisores inhibitoras en la médula espinal de la lamprea de mar durante la regeneración.....	114
Evolución de las poblaciones de células inhibitoras.....	114
Evolución del número de fibras inhibitoras.....	116
Comparación con otros vertebrados.....	116
CONCLUSIONES.....	118
BIBLIOGRAFÍA.....	122
PUBLICACIONES.....	139

INTRODUCCIÓN GENERAL





INTRODUCCIÓN GENERAL

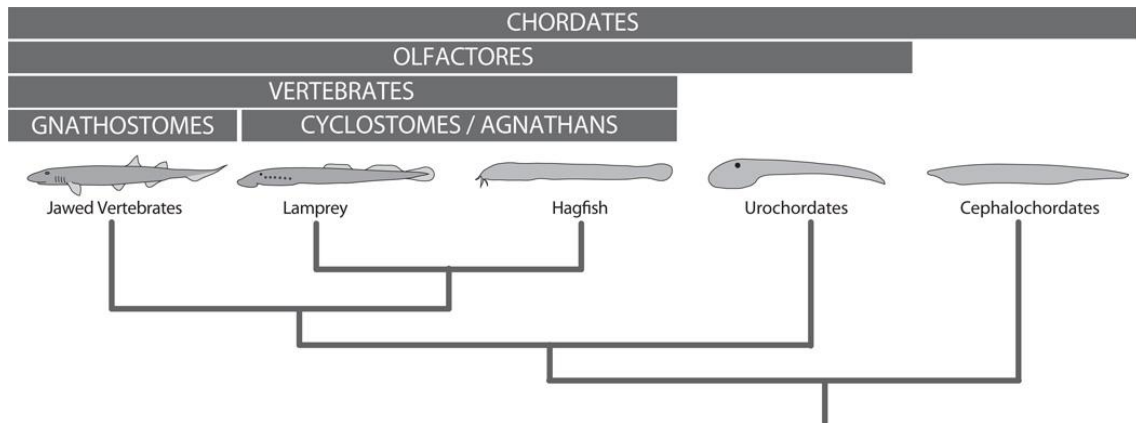
Lesión medular

En España, se estima que la incidencia anual de daño por traumatismo en la médula espinal es de 30 casos por cada millón de habitantes, lo que supone unos 1000 nuevos casos cada año, con aproximadamente el 80 % de las lesiones en personas cuya edad está comprendida entre los 16 y 45 años (datos del Servicio de Información sobre Discapacidad, Ministerio de Sanidad, Servicios Sociales e Igualdad). En los mamíferos (y, por tanto, en los seres humanos), las lesiones medulares causan daños permanentes e irreversibles, debido, principalmente, a la ausencia de regeneración de las conexiones neuronales que se ven interrumpidas tras la lesión. La baja capacidad regenerativa se debe a factores extrínsecos, como la liberación de moléculas inhibitoras del crecimiento axónico tras la lesión y a factores intrínsecos, como la baja capacidad de regeneración de los axones de las neuronas del sistema nervioso central (SNC). Además, tras una lesión medular, debido a procesos inflamatorios, se produce una muerte masiva de neuronas y células gliales que no son reemplazadas (revisado en Rodicio y Barreiro-Iglesias, 2012).

Dado que las lesiones medulares constituyen un grave problema personal, social y económico es necesario avanzar en el conocimiento de los factores que impiden o promueven la regeneración con el fin de aportar datos que a la larga permitan el diseño de terapias efectivas. A diferencia de lo que ocurre en mamíferos, las lampreas y algunas especies de peces, anfibios y reptiles son capaces de recuperar la motilidad después de una lesión medular y constituyen modelos efectivos para el estudio de las condiciones y los factores que permiten lograr la recuperación de la función.

La lamprea como modelo en neurobiología y regeneración

Las lampreas, junto con los mixinos, son los representantes vivos más antiguos de los vertebrados. Pertenecen al grupo de los agnatos (peces sin mandíbula) (Hubbs y Potter, 1971; Mallatt y Winchell, 2007; Janvier, 2010), también denominados ciclóstomos, y ocupan una posición filogenética única entre los Amphioxus (procordados) y los gnatostomados (vertebrados con mandíbula) (Hardisty, 1983; Kuratani y col., 2002; Takezaki y col., 2003). Las lampreas se distribuyen en las zonas templadas de ambos hemisferios y se pueden encontrar tanto en aguas dulces como saladas. Muchas especies de lamprea son parásitas y se alimentan de sangre y linfa al fijar su ventosa bucal a la piel de diferentes peces. Sin embargo, todas las lampreas pueden alimentarse también de pequeños invertebrados.



Posición filogenética de las lampreas, tomado de Green y Bronner, 2014.

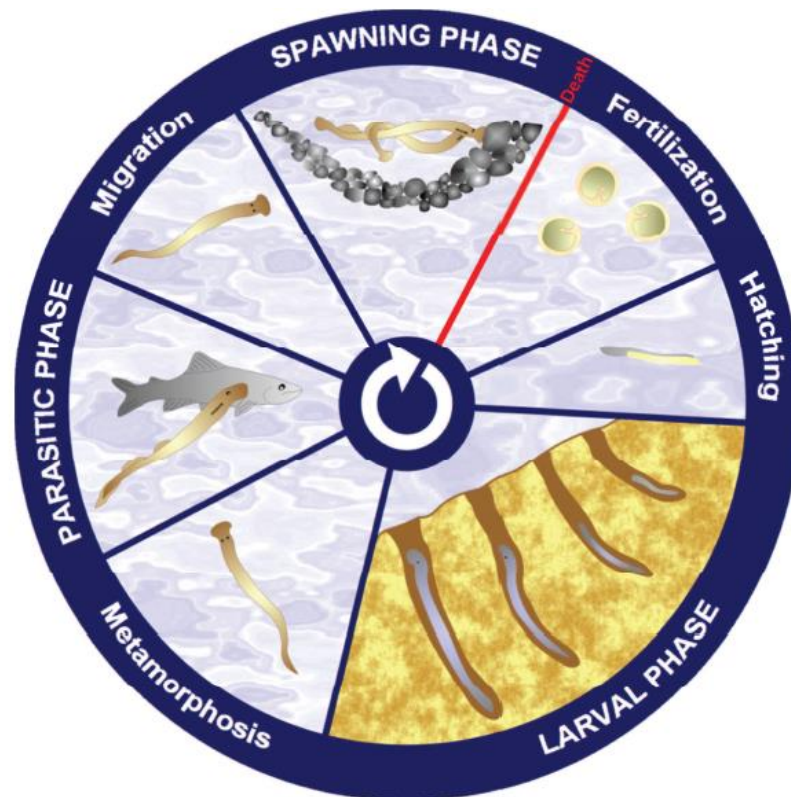
La lamprea de mar, *Petromyzon marinus*, es la especie de lamprea que se puede encontrar en los ríos de Galicia y la que se ha utilizado en este estudio.



Joven adulto de lamprea de mar

Tiene un complejo ciclo de vida que empieza en el río con el periodo embrionario, que dura aproximadamente 12 días, al que le siguen un corto periodo prolarvario, en el que se alimentan del vitelo almacenado y un largo periodo larvario, durante el cual viven enterradas en el fango y se alimentan por filtración. Mediante una compleja metamorfosis las larvas se transforman en jóvenes adultos. Los cambios durante la metamorfosis incluyen: una reorganización radical de los órganos internos, la erupción y maduración de los ojos, modificación de la región prebranquial, que da lugar a la formación de un disco oral especializado para la succión, desarrollo de dientes y de otras estructuras bucales, transformación de la estructura de las branquias para permitir la respiración tidal y conversión de una larva que vive enterrada y se alimenta por filtración en un depredador nadador

eficiente. Terminada completamente la metamorfosis, los jóvenes adultos migran al mar, donde viven durante uno o dos años como parásitos de otros peces. Tras este tiempo regresan al río para aparearse y, tras la puesta, mueren (Hardisty y Potter, 1971).

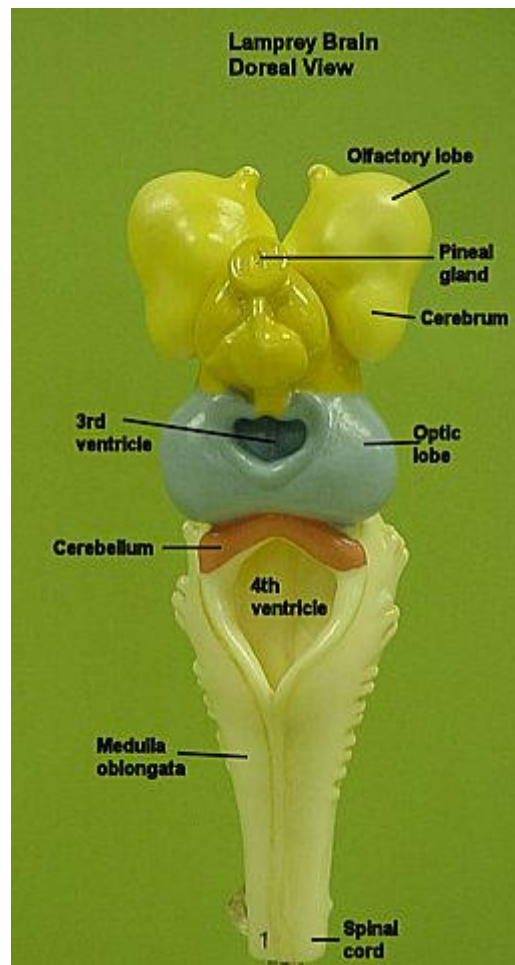


Ciclo de vida de la lamprea

El sistema nervioso central de las lampreas (revisado en Nieuwenhuys and Nicholson, 1998), puede ser considerado el prototipo de los vertebrados debido a que posee todas las características básicas del sistema nervioso central de los vertebrados, pero con muchas menos neuronas que en mamíferos. Algunas de sus neuronas son células de proyección espinal gigantes que son fácilmente indistinguibles.

La posición filogenética de las lampreas y su complejo ciclo de vida han hecho que sean un modelo atractivo y muy utilizado en estudios de evolución y desarrollo (*evo-devo*) (revisiones en Kuratani y col., 2002 y Osorio y Rétaux., 2008) y en estudios centrados en descifrar los cambios adaptativos a los diferentes estilos de vida de las larvas y los adultos. La simplicidad de su sistema nervioso, junto con su accesibilidad, facilidad de manipulación y

capacidad de supervivencia del tejido *in vitro*, las han convertido también en un modelo adecuado para determinar las redes y circuitos neuronales implicados en el proceso de locomoción en los vertebrados (Grillner y col., 2008). Estos estudios han hecho que las lampreas sean los organismos que han proporcionado una información más detallada a nivel celular y de redes neuronales acerca de dicho proceso. La facilidad de identificación y manipulación de las neuronas gigantes del cerebro de las lampreas ha permitido que se utilicen también como modelo para estudiar los efectos citotóxicos de proteínas relacionadas con la enfermedad de Alzheimer (Hall, 1999; Hall y col., 2000; Honson y col., 2009; Lee y col., 2012).



Esquema del cerebro de la lamprea

En la actualidad, y desde mediados del siglo pasado, las lampreas también se utilizan como un modelo interesante en estudios de regeneración del SNC, ya que después de una sección medular completa son capaces de recuperar la locomoción espontáneamente (Shifman y Selzer, 2007). En 1980, el NIH propuso cinco criterios que se deben cumplir para demostrar

la existencia de regeneración funcional de la médula espinal (Guth y col., 1980). Dichos criterios son los siguientes:

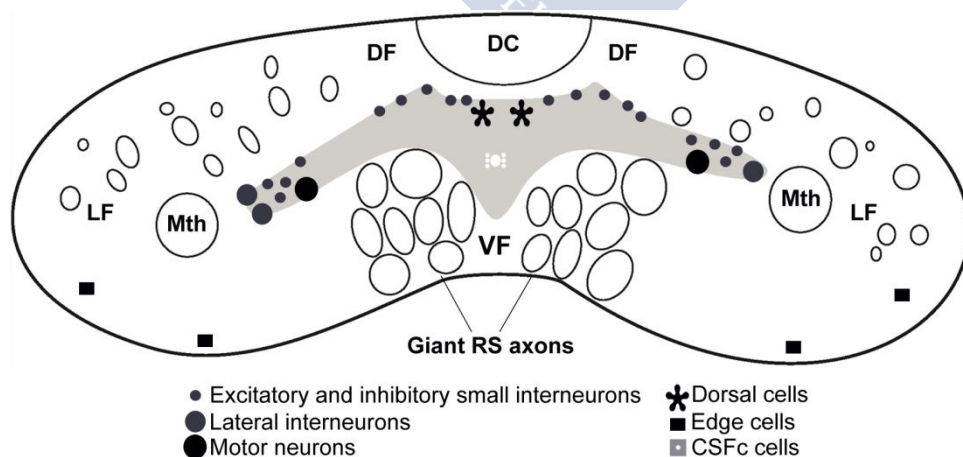
- 1.- La lesión experimental debe causar desconexión de las prolongaciones nerviosas.
- 2.- Las prolongaciones de las neuronas del sistema nervioso central deben ser capaces de atravesar la región de la lesión.
- 3.- Las fibras regeneradas deben realizar contactos sinápticos.
- 4.- Las fibras regeneradas deben generar respuestas postsinápticas.
- 5.- Los cambios en la función deben derivarse de las conexiones regeneradas.

Hasta el momento, la lamprea es el único vertebrado en el que se ha demostrado que se cumplen los cinco criterios.

Recientemente, las lampreas también han sido propuestas como modelo para los estudios de regeneración desde el punto de vista evolutivo, para los cuales se ha acuñado el término *evo-rego* (Barreiro Iglesias, 2012).

La médula espinal de la lamprea

La médula espinal de la lamprea es aplanada, lo que facilita la difusión de oxígeno y metabolitos a su interior ya que carece de vasos sanguíneos. En sección transversal, se distinguen: la sustancia gris, que ocupa una posición central, rodea el canal central y se expande lateralmente y la sustancia blanca, situada en la periferia y que, aunque recibe este nombre, no tiene color blanco ya que los axones de la lamprea son amielínicos. En la sustancia blanca hay cuerpos de neuronas emigradas, prolongaciones dendríticas y contactos sinápticos. Las raíces dorsales y ventrales presentan alternancia debido al curso intramiotómico de las raíces dorsales y de la finalización intramiotómica de las raíces ventrales, por lo que no forman nervios espinales mixtos (Nieuwenhuys y Nicholson, 1998).



Esquema de la médula espinal de lamprea

En la médula espinal se distinguen tres tipos celulares según su función:

- Células dorsales: son células sensitivas primarias situadas en posición dorsomedial, formando dos filas longitudinales. Tienen una prolongación periférica (que sale con las raíces dorsales y termina en la piel, donde recibe estimulación mecánica), una prolongación rostral larga que cursa en la columna dorsal y una ventral corta.
- Células motoras: situadas en la parte ventrolateral de la sustancia gris formado dos columnas longitudinales. Pueden ser somáticas o viscerales.
- Interneuronas: sus prolongaciones permanecen en el SNC. Son heterogéneas en cuanto a posición, distribución, tamaño, morfología y conexiones (revisiones en Rovainen, 1979; Buchanan, 1996; 1999; 2001). En función de estos criterios se clasifican en:
 - Gigantes: situadas únicamente en el tercio caudal de la médula, son células sensitivas de segundo orden cuyos axones proyectan contralateral y rostralmente pudiendo acabar en la médula o en la parte posterior del cerebro.
 - Laterales: son las interneuronas más grandes de la parte rostral de la médula espinal de lamprea, su axón proyecta ipsilateral y caudalmente e inhiben interneuronas caudales cruzadas.
 - Interneuronas caudales contralaterales: participan en la red locomotora espinal. Su inhibición provoca la activación del lado opuesto de la médula.
 - Interneuronas excitadoras: también participan en la red locomotora y tienen un papel en la generación del ritmo.
 - Interneuronas inhibitorias: son otro componente de la red locomotora, responsables de la alternancia derecha-izquierda del patrón locomotor.
 - Células del borde: están situadas en los tractos laterales, generalmente contra el borde ventrolateral de la médula espinal. Son receptores de tensión y pueden ser excitadoras que contactan con neuronas ipsilaterales o inhibitorias, cuyas prolongaciones cruzan la línea media inhibiendo neuronas contralaterales.
 - Células que contactan con el líquido cerebroespinal (CSF): se sitúan alrededor del canal central, al que envían una prolongación. Son de distintos tipos atendiendo al neurotransmisor que expresan.

La sustancia blanca se divide en tres funículos: dorsal, lateral y ventral. Por ellos corren tractos ascendentes, descendentes e intrínsecos.

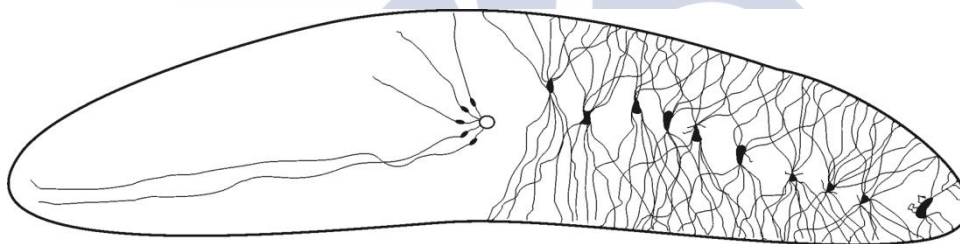
Los tractos ascendentes largos son la columna dorsal y el lemnisco lateral. Por la columna dorsal cursan fibras sensitivas procedentes de las células de los ganglios de las raíces dorsales y de las células dorsales, que llevan información sensorial de la piel al tronco cerebral. El lemnisco espinal está formado por fibras que cursan por el fascículo lateral

llevando información sensitiva al cerebro e información de los patrones motores al tronco cerebral.

Los tractos descendentes son el retículoespinal y el vestibuloespinal. Varios estudios han mostrado la citoarquitectura de las neuronas que proyectan a la médula en el cerebro de la lamprea de mar (Ronan, 1989; Swain y col., 1993; Davis y McClellan, 1994, Barreiro-Iglesias y col., 2008a; b). El tracto retículoespinal tiene su origen en las células reticulares del núcleo del fascículo longitudinal medial situado en el diencéfalo y de los núcleos reticulares mesencefálico y rombencefálicos (el sistema retículoespinal será tratado con más detalle a continuación). El sistema vestibuloespinal consta de alrededor de 400 neuronas y se localiza a nivel de los núcleos octavomotor intermedio (Bussières y col., 1999) y posterior (Pombal y col., 1994, Bussières y col., 1999) y proyecta sólo a la médula espinal rostral.

Los tractos intrínsecos están formados por fibras intersegmentales cortas mediadoras de reflejos (Ariens Kappers, 1947).

Además de las neuronas y sus prolongaciones, otro componente importante de la médula espinal de la lamprea es la glía, constituida por los endimocitos y los astrocitos. Los endimocitos rodean el canal central y tienen una corta prolongación apical y una larga prolongación lateral. Los cuerpos de los astrocitos forman una banda en la sustancia gris que se prolonga lateralmente hacia la sustancia blanca. Sus prolongaciones se extienden radialmente hasta las superficies dorsal y ventral de la médula. Las células gliales de la lamprea tienen citoqueratinas y carecen de proteína ácido fibrilar glial.



Esquema mostrando las células de glía de la médula espinal de la lamprea.

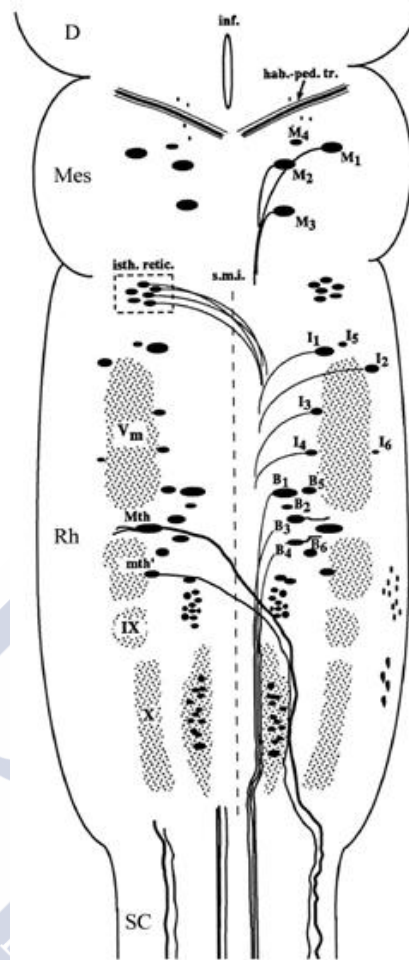
El sistema retículoespinal de la lamprea

Varios estudios han mostrado la citoarquitectura de las neuronas que proyectan a la médula en el cerebro de la lamprea de mar (Ronan, 1989; Swain y col., 1993; Davis y McClellan, 1994, Barreiro-Iglesias et al., 2008a; b). El sistema descendente en lamprea adulta consta de aproximadamente 2400 neuronas retículoespinales. La mayoría de estas células, aproximadamente 2000, se originan en los núcleos reticulares (Swain y col., 1993)

considerados tradicionalmente como mesencefálicos y rombencefálicos, aunque parte de las neuronas más rostrales son diencefálicas.

El núcleo reticular mesencefálico (MRN) contiene alrededor de 90 células reticuloespinales que proyectan ipsilateralmente a la médula espinal, incluidas tres células de Müller (M1-M3) a cada lado de la línea media (Bussières y col., 1999; Dubuc y col., 2008). El resto de las neuronas reticuloespinales se localizan a nivel rombencefálico. La formación reticular rombencefálica ha sido dividida en tres o cuatro regiones dependiendo de los distintos tipos de estudios e investigadores. Cuatro regiones fueron descritas y/o utilizadas por Koyama y col. (1989), Ronan y Northcutt (1990), Pombal y col. (1997, 2001, 2006) y Villar-Cerviño y col. (2008a, 2009): formación reticular ístmica (IsRF), formación reticular trigeminal (TRF), formación reticular medial (MRF) y formación reticular posterior (PRF). Sin embargo, otros autores como Nieuwenhuys (1977), Ronan (1989) y Davis y McClellan (1994) clasifican los núcleos en tres grupos: núcleo rombencefálico reticular anterior (ARRN), núcleo rombencefálico reticular medial (MRRN) y núcleo rombencefálico reticular posterior (PRRN). Los núcleos medio y posterior son equivalentes en las dos nomenclaturas, la diferencia está en el núcleo anterior, en el que los autores que establecen cuatro regiones subdividen este núcleo reticular anterior en dos. La región más rostral se localiza a nivel del istmo (IsRF). La segunda región se sitúa a nivel del núcleo motor del nervio trigémino (TRF).

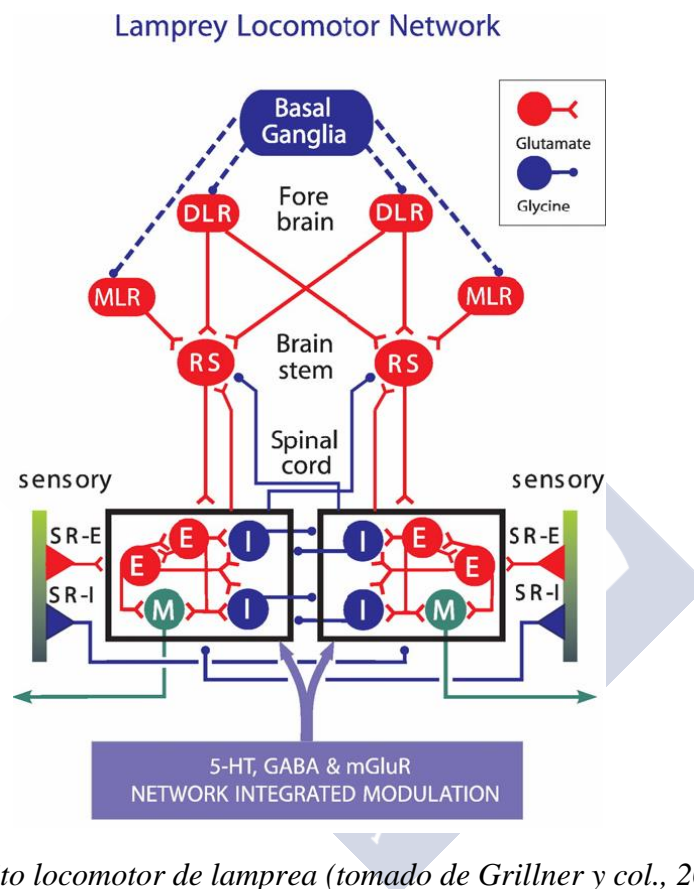
El ARRN contiene alrededor de 90 células en la lamprea adulta, de las cuales, alrededor del 30% proyectan contralateralmente (Dubuc et al., 2008). Este núcleo incluye las células de Müller (I1-I6) que proyectan ipsilateralmente. Los núcleos rombencefálicos reticulares más caudales contienen el 90% de todas las células reticuloespinales. El MRRN tiene aproximadamente 330 células reticuloespinales, de las que el 20% proyectan al lado contralateral, incluida la célula de Mauthner, que envía un prominente axón a la región dorsolateral de la médula espinal (Rovainen, 1967; Dubuc y col., 2008). En el MRRN también se encuentran las células de Müller B1-B6, todas ellas con proyección ipsilateral. El PRRN es el núcleo reticular de mayor tamaño. Se extiende rostrocaudalmente por la mitad posterior del rombencéfalo y consta de alrededor de 730 células reticuloespinales, de las cuales aproximadamente un 16% proyectan contralateralmente (Dubuc y col., 2008).



Esquema que muestra una vista dorsal del cerebro de la lamprea de mar con la localización de las neuronas reticuloespinales, que son identificables individualmente, de los núcleos reticuloespinales y de los núcleos motores de los nervios craneales. B1-B6: células de Müller de la región bulbar; D: diencéfalo; hab.-ped. tr.: tracto habenuropeduncular; I1-I6: células de Müller de la región ístmica; inf.: infundíbulo; Isth: istmo; Isth. retic.: formación reticular ístmica; IX: núcleo motor del glossofaríngeo; M1-M4: células de Müller 1 a 4; Mes: mesencéfalo; Mth: células de Mauthner; Mth': células de Mauthner auxiliares; Rh: rombencéfalo; SC: médula espinal; s.m.i.: sulco mediano inferior; Vm: núcleo motor del trigémino; X: núcleo motor vagal. (Tomado de Rodicio y Barreiro Iglesias, 2012).

El circuito locomotor en lampreas

Al igual que en el resto de los vertebrados, el circuito locomotor incluye los circuitos espinales que coordinan los movimientos básicos en la propulsión. Estos circuitos se localizan en los centros generadores de patrones (CPGs), en los sistemas comando del tronco encefálico y en los sistemas de control (revisión en Grillner y Wallén, 1985).



En la lamprea, estos circuitos están inhibidos durante el reposo y necesitan ser activados desde centros comando localizados a nivel del tronco encefálico, las regiones locomotoras mesencefálica (MLR) y diencefálica (DLR). Éstas regulan el nivel de actividad de los CPGs espinales a través de las neuronas reticuloespinales (Grillner y col., 2008). Además de ser iniciada, la locomoción debe tener la capacidad de adaptarse en respuesta a entradas comportamentales específicas o a diversas perturbaciones, como por ejemplo, cuando la cabeza del animal contacta con una superficie sólida. La formación reticular rombencefálica integra la información sensorial, visual y vestibular, que controla la orientación, así como la postura y la información motora procedente de los ganglios basales (Deliagina y col., 1992; 1993; 2000; Deliagina y Fagerstedt, 2000). De este modo, inicia la locomoción y ejerce efectos modificadores sobre los circuitos espinales que son necesarios

para el control del equilibrio y la orientación, determinando así qué programas de movimiento deben ser activados a cada instante (Grillner y col., 1995; Deliagina y Fagerstedt; 2000; Deliagina y col., 2000). Finalmente, en todos los vertebrados, las neuronas del CPG de la médula espinal son moduladas por sistemas locales de retroalimentación sensitiva.

El patrón motor se genera a nivel espinal por los CPGs. Los CPGs son los responsables de la activación secuencial de las diferentes motoneuronas y, por tanto, de los grupos musculares que participan en el movimiento (Grillner y col., 1981; Grillner 1981, 2003; Rossignol y col., 2006; Grillner y col., 2008). Los principales elementos de los circuitos implicados en la generación de disparos segmentales son las interneuronas premotoras excitadoras glutamatérgicas (EINs), que activan motoneuronas a través de receptores N-metil-D-aspartato (NMDA) y ácido alfa-amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazolpropiónico (AMPA). Las EINs forman un “pool” dentro de cada segmento y los segmentos se excitan entre ellos (Buchanan y Grillner, 1987; Cangiano y Grillner, 2005). Además, también activan interneuronas inhibitoras que cruzan la línea media, encargadas de coordinar las EINs de ambos lados, de manera que emerja el patrón alternante (Grillner y col., 2008). Además, varios sistemas, entre ellos el sistema GABAérgico (Fagerstedt y col., 2000; Homma y Rovainen, 1978; Grillner y Wallén, 1980; Grillner, 2003), modulan la locomoción. El GABA actúa postsinápticamente disminuyendo la actividad excitadora vía receptores GABA_A y GABA_B (Schmitt y col., 2004) y presinápticamente sobre las dendritas y el soma de las neuronas de la red reduciendo el patrón de descargas (Tegnér y col., 1993; Matsushima y col., 1993).

Neurotransmisores inhibidores

Sistemas glicinérgico y GABAérgico

Las neuronas glicinérgicas y GABAérgicas representan los principales sistemas inhibidores rápidos en el cerebro y la médula espinal de los vertebrados. Aparecen pronto en el desarrollo embrionario y en animales inmaduros. Durante el desarrollo, el GABA y la glicina provocan la despolarización de la membrana por la salida de Cl⁻, resultante de una concentración intracelular de Cl⁻ alta (Wang y col., 1994; LoTurco y col., 1995; Chen y col., 1996; Kazatu y col., 1999). Esta despolarización permite el incremento de la concentración intracelular de Ca²⁺, el cual tiene una función muy importante en el desarrollo neuronal (LoTurco y col., 1995; Ikeda y col., 1997), siendo crucial para la formación correcta de las especializaciones postsinápticas en las sinapsis glicinérgicas (Kirsh y Betz, 1998).

La acción inhibitoria del aminoácido glicina aparece como consecuencia de la conductancia al Cl⁻ en la membrana postsináptica, cuando se activan los receptores de glicina (Young y Snyder, 1974; Backer y Ramson, 1978; Betz, 1987; Bormann y col., 1987). El receptor de glicina (GlyR) es un canal iónico dependiente de ligando que media inhibición post-sináptica en la médula espinal y en otras regiones del sistema nervioso central de los vertebrados (revisión en Betz y Becker, 1988; Langosch y col., 1990). La glicina es también un coagonista obligatorio de los receptores NMDA de glutamato. El receptor NMDA es un canal iónico formado por múltiples subunidades que posee sitios de unión para el glutamato y

un sitio de unión para un regulador alostérico (glicina y/o la D-serina) como coagonista (revisión en Wood, 2005).

La acción de la glicina termina al ser recaptada por dos miembros de la familia de transportadores de neurotransmisores dependientes de Na^+/Cl^- (GLYT1 y GLYT2), que la internalizan en la célula, donde es degradada por el sistema de escisión (degradación) de la glicina, un complejo enzimático mitocondrial y citosólico. GLYT1 es considerado principalmente un transportador glial, aunque también es expresado en neuronas, mientras que GLYT2 es un transportador neuronal (revisión en Zafra y Giménez, 2008). La glicina es captada por las vesículas sinápticas a través del transportador vesicular de aminoácidos inhibidores (VIAAT) que está presente también en las neuronas GABAérgicas, donde transporta GABA.

El GABA se sintetiza por descarboxilación del L-glutamato, reacción catalizada por la enzima L-glutamato descarboxilasa (Roberts y Frankel, 1950). Hay tres tipos de receptores de GABA: dos receptores ionotrópicos, GABA_A y GABA_C y un receptor metabotrópico, GABA_B . Estos receptores se diferencian en sus propiedades farmacológicas y en su distribución a lo largo del sistema nervioso central (Bormann y Feigenspan, 1995; Lukasiewicz, 1996). La recaptación del GABA es mediada por transportadores denominados GAT (1-4).

La glicina y el GABA compiten por el transportador vesicular. Los terminales GABAérgicos puros poseen concentraciones metabólicas de glicina. La biosíntesis de GABA por las glutamato descarboxilasas y su acumulación en el citosol gracias a los transportadores de membrana específicos para el GABA, evitan la entrada significativa de glicina en las vesículas sinápticas. En los terminales glicinérgicos puros, la acumulación de glicina en el citosol debida a la presencia del transportador de membrana GLYT2, hace que se encuentre a concentraciones suficientes como para ser acumulada dentro de las vesículas sinápticas. El transportador de membrana GLYT1 es mucho menos eficaz en la acumulación de glicina en el citosol, ya que también puede trabajar a la inversa, sacando glicina del citosol. La co-expresión de glicina y GABA en un mismo terminal se debe al balance entre la expresión y la actividad de los transportadores de membrana, junto con el metabolismo o secuestro intracelular de los neurotransmisores.

La glicina y el GABA liberadas por la misma vesícula pueden unirse a distintos tipos de receptores (cada uno al suyo propio) situados en la misma región postsináptica o pueden actuar como coagonistas de los receptores de glicina, acelerando la transmisión glicinérgica, como sugieren experimentos realizados en teleósteos (David-Watine y col., Imboden y col., 2001). También se ha sugerido la existencia de receptores activados por glicina y GABA en lamprea (Baev y col., 1992).

Neurotransmisores inhibidores en el sistema nervioso central de la lamprea

La distribución de las poblaciones y fibras que expresan glicina o GABA ha sido estudiada tanto en el cerebro adulto (GABA: Meléndez-Ferro, 2001 Meléndez-Ferro y col. 2000; 2001; Rodicio y col., 2005; Robertson y col., 2007; glicina; Villar-Cerviño y col., 2007; 2008a) como durante el desarrollo (GABA: Meléndez-Ferro y col., 2000; 2002, 2003; glicina; Villar-Cerviño y col., 2009).

El patrón de desarrollo de las poblaciones glicinérgicas es complejo, incluyendo poblaciones de aparición temprana, poblaciones que expresan glicina transitoriamente y poblaciones que aparecen durante la metamorfosis. La mayoría de las neuronas glicinérgicas del cerebro adulto se encuentran en el mesencéfalo y rombencéfalo, aunque también hay poblaciones en los bulbos olfatorios, el núcleo preóptico y el tálamo. Estas tres últimas poblaciones no están presentes en el cerebro de mamíferos y, aunque hay estudios en pocos grupos de vertebrados, la comparación de la distribución de las poblaciones entre lamprea y mamíferos sugiere que a lo largo de la evolución de los vertebrados se ha producido una disminución de las poblaciones glicinérgicas en el cerebro anterior y una especialización de las poblaciones del tronco cerebral.

Las neuronas GABAérgicas están ampliamente distribuidas en el sistema nervioso central, desde los bulbos olfatorios hasta la médula espinal. La mayoría de las neuronas GABAérgicas son pequeñas y aparecen mezcladas con neuronas no GABAérgicas. Estos estudios indican que el sistema GABAérgico apareció tempranamente durante la evolución y que los patrones espacio-temporales de expresión han sido muy conservados entre los diferentes grupos de vertebrados.

En los núcleos rombencefálicos reticulares se han descrito neuronas inmunorreactivas a glicina (Villar Cerviño y col., 2008a, 2009) y GABA (Meléndez-Ferro, 2003; Robertson y col., 2007). Además, en un estudio electrofisiológico se ha mostrado que un grupo de neuronas reticuloespinales inhiben sus neuronas diana mediante su acción sobre receptores de glicina (Wannier y col., 1995). En estos núcleos hay además numerosas neuronas pequeñas y medianas glutamatérgicas (Villar-Cerviño y col., 2013), cuyos axones activan patrones generadores de la natación (El Manira y col., 1997; Brocard y Dubuc, 2003) así como neuronas grandes que, aunque no muestran inmunoreactividad a glutamato (Villar-Cerviño y col., 2013), expresan el transportador vesicular de glutamato (Villar-Cerviño y col., 2013). y han sido caracterizadas como glutamatérgicas en estudios electrofisiológicos (Rovainen, 1967; Wickelgreen, 1977; Buchanan y Grillner, 1987; Buchanan y col., 1987; Ohta y Grillner, 1989).

Sólo en algunas poblaciones glicinérgicas del cerebro de lamprea adulta, se ha observado colocalización de glicina y GABA. En la mayor parte de ellas, o no hay colocalización o es poco abundante (Villar-Cerviño y col., 2008a). Colocalización de glicina y GABA también ha sido descrita en algunas poblaciones del cerebro de otros vertebrados (Reichenberger y Dieringer 1994; Berki y col., 1995; Reichenberger y col., 1997; Higashijima y col., 2004).

Las neuronas GABAérgicas de la médula espinal de las lampreas han sido ampliamente estudiadas (Batueva y col., 1990; Brodin y col., 1990; Christenson y col., 1991; Shupliakov y col., 1996; Meléndez-Ferro, 2001; Ruiz y col., 2004; Villar-Cerviño y col., 2008a), mientras que las neuronas glicinérgicas han recibido menos atención (Shupliakov y col., 1996; Gustafsson y col., 2002; Villar-Cerviño y col., 2008a; b). En tres poblaciones de interneuronas de la médula espinal, población dorsomedial, población lateral y en la población de neuronas CSFc, hay células que expresan glicina y/o GABA. Sólo una pequeña parte de las neuronas de estas poblaciones coexpresan glicina y GABA. Además de las neuronas de estas tres poblaciones, algunas células del borde expresan glicina. Aunque la

mayoría de las neuronas de la médula espinal participan en circuitos intrínsecos locales, algunas neuronas laterales, parte de las cuales son inhibitoras, son espinobulbares (Revisión en Buchanan y Einum 2008). Muchas de las neuronas espinobulbares también tienen proyección descendente (Einum y Buchanan, 2006).

Respuesta a la lesión y papel durante la regeneración de los sistemas inhibitorios en el sistema nervioso central

La lesión medular produce daños mecánicos que conducen a la muerte de las neuronas afectadas, lo que se conoce con el nombre de respuesta primaria. Alrededor de esta región tiene lugar una extensión progresiva de los daños, lo que se conoce con el nombre de respuesta secundaria. Los daños que se producen durante la respuesta secundaria se deben a la rotura de la barrera hematoencefálica, invasión de células sanguíneas, activación de la microglía, falta de oxígeno, excitotoxicidad, formación de especies reactivas de oxígeno, liberación de proteasas y depleción de la disponibilidad de energía (revisión en Hausmann, 2003).

La excitotoxicidad se refiere a la muerte de neuronas y células gliales que se produce por la acción prolongada de los neurotransmisores excitadores glutamato y aspartato, que son liberados en exceso tras una lesión medular (Liu y col., 1991; 1999). La elevación de la concentración de glutamato extracelular provoca la activación de receptores de glutamato, desencadenando una entrada masiva de Ca^{+2} en las células que conduce a la muerte neuronal (Choi, 1988). Estudios de nuestro grupo han demostrado que la liberación de glutamato en respuesta a una lesión medular también tiene lugar en lampreas (Fernández-López y col., 2014b).

Además de la liberación de neurotransmisores excitadores, la lesión medular también provoca la liberación de neurotransmisores inhibitorios (Demediuk y col., 1989; Panter y col., 1990). Debido a su papel como coagonista de los receptores NMDA, el incremento de los niveles extracelulares de glicina después de la lesión medular puede potenciar la excitotoxicidad causada por el glutamato (Panter y col., 1990). La liberación de GABA, sin embargo, parece tener un efecto neuroprotector mediante la activación de los receptores GABA y subsiguiente inhibición de la apoptosis (Han y col., 2008). En lampreas se ha observado una correlación entre el aumento de la inhibición por GABA y una mejor recuperación de la funcionalidad en animales con lesión espinal (Svensson y col., 2013). Durante el desarrollo, el GABA puede influir en la supervivencia celular, así como promover y modular la migración celular, el crecimiento de neuritas y la formación de sinapsis (Owens y Kriegstein, 2002; Ben-Ari y col., 2007; Sernagor y col., 2010; revisado en Gaiarsa y Porcher, 2013), por lo que no es descartable que tenga papeles similares durante la regeneración axónica.

Los daños producidos en la médula espinal afectan tanto a las neuronas intrínsecas de la médula y sus prolongaciones, como al sistema extrínseco (constituido por axones descendentes originados en neuronas cerebrales y axones de neuronas sensitivas situadas en los ganglios raquídeos). Aunque la recuperación de la función se ha asociado principalmente a la regeneración de los axones descendentes dañados, cada vez hay más estudios que muestran la importancia de las neuronas intraespinales en la recuperación funcional (revisión en Filli y Schwab, 2015). En lampreas, tanto los axones descendentes (Yin y Selzer, 1983; Davis y McClellan, 1994; Rouse y McClellan, 1997) como los de las neuronas propioespinales (Yin y Selzer, 1983; Armstrong y col., 2003) pueden regenerar a través del lugar de la lesión y

formar sinapsis funcionales (Mackler y Selzer, 1985). Sin embargo, el proceso de regeneración no lleva a una situación idéntica a la anterior, ya que no todos los axones regeneran, los que regeneran no siguen exactamente la misma trayectoria y se pueden formar sinapsis en lugares atípicos, sinapsis que poseen características estructurales que las diferencian de las presentes en animales no dañados (Rovainen, 1976, Selzer, 1978; Wood y Cohen, 1978; Oliphin y col, 2010).

Debido a la importancia del GABA en la modulación de los circuitos espinales, las alteraciones en el sistema GABAérgico provocan un deterioro de la función. En roedores, la pérdida de interneuronas GABAérgicas responsables de la modulación fásica provoca déficits motores (Fink y col., 2014) y los niveles de GABA o de sus enzimas de síntesis (GAD67 y GAD65), disminuyen en el asta dorsal en distintos modelos de daño medular (Gwak y col, 2008; Meisner y col., 2010; Zhang y col., 1994). En gatos se ha visto que una sección medular completa de la médula espinal produce un incremento en la expresión de GAD67, pero no de GAD 65, en la zona caudal a la lesión (Tillakaratne y col., 2000). El descenso del tono GABAérgico en el asta dorsal de la médula espinal es un factor clave en el desarrollo del dolor neuropático central después de una lesión medular (Drew y col., 2004; Liu y col., 2004; Gwak y col., 2006; Zhang y col., 1994).

Estudios de nuestro grupo han analizado los cambios en los sistemas dopaminérgico (Fernández-López y col., 2015) y glutamatérgico (Fernández-López y col., 2016) en la médula espinal de la lamprea durante la regeneración, pero la evolución de los sistemas inhibidores no ha sido estudiada.





JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS





JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS

El presente trabajo se encuadra dentro de los estudios que nuestro grupo está realizando sobre el posible papel de los neurotransmisores en la regeneración espinal.

Como objetivo de esta tesis doctoral nos hemos propuesto analizar los cambios que tienen lugar en los sistemas de neurotransmisores inhibidores (GABAérgico y glicinérgico) de la médula espinal de la lamprea de mar en respuesta a la lesión medular y durante la regeneración. La identificación de los cambios que tienen lugar en la médula espinal en vertebrados que recobran espontáneamente la locomoción después de una lesión medular puede ofrecer pistas para determinar los factores clave que conducen a la recuperación de la función y para descifrar los mecanismos de plasticidad que tienen lugar durante el proceso de regeneración.

Se sabe que en la médula espinal de la lamprea los sistemas GABAérgico y glicinérgico de la médula espinal constan de un componente intrínseco constituido por neuronas espinales y sus prolongaciones, y, en el caso del sistema glicinérgico, también de un componente extrínseco formado por fibras descendentes procedentes de neuronas localizadas en el tronco cerebral. Un paso previo para determinar los cambios en los distintos sistemas implicados en la locomoción es conocer su organización en el animal intacto. A pesar de la abundancia de estudios sobre las proyecciones reticuloespinales en lampreas, es muy poco lo que se conoce sobre las proyecciones reticuloespinales inhibitoras. Ya que los anticuerpos generados contra neurotransmisores aminoacidérgicos marcan el soma de las neuronas en el sistema nervioso central en lampreas (Meléndez-Ferro y col., 2002,2003; Robertson y col., 2007; Villar-Cerviño y col., 2008a; b; 2009), hemos decidido empezar por caracterizar las proyecciones reticuloespinales inhibitoras mediante la combinación de trazado neuronal retrógrado y técnicas de inmunofluorescencia. Por ello, los objetivos concretos de este trabajo son:

- 1.- Estudiar el patrón de distribución de las neuronas reticulares glicinérgicas de proyección espinal.
- 2.- Conocer si existen neuronas reticulares GABAérgicas que proyecten a la médula espinal y en caso afirmativo estudiar su patrón de distribución.
- 3.- Conocer si hay neuronas reticuloespinales inhibitoras que colocalicen glicina y GABA.
- 4.- Analizar los cambios de expresión de los neurotransmisores inhibidores en respuesta a la lesión. Para ello, analizaremos el patrón de expresión espaciotemporal de la inmunorreactividad a GABA y glicina durante la primera semana después de la sección completa de la médula espinal.

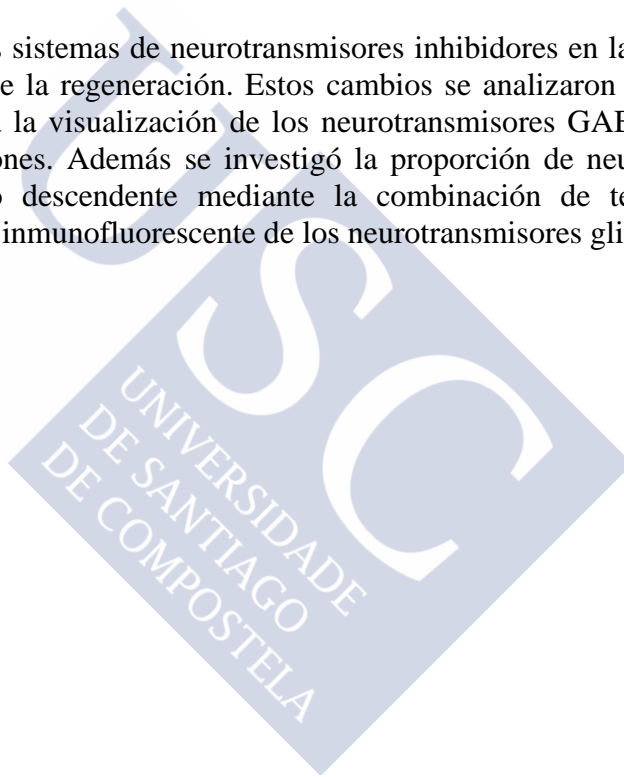
5.- Analizar los cambios de expresión de los neurotransmisores inhibidores durante la regeneración medular en larvas de lamprea de mar.

Los resultados y la discusión de esta tesis doctoral han sido organizados en tres apartados:

1.- Proyecciones rombencefálicas inhibitoras descendentes en larvas de lamprea de mar. Las proyecciones descendentes inhibitoras se analizaron mediante la combinación de técnicas de trazado neuronal con la detección inmunofluorescente de los neurotransmisores glicina y GABA.

2.- Cambios en los sistemas de neurotransmisores inhibidores en respuesta a una lesión medular en lamprea de mar. La lesión medular consistió en una sección medular completa a nivel de la quinta branquia y los cambios en los sistemas de neurotransmisores inhibidores se detectaron mediante técnicas de inmunofluorescencia.

3.- Cambios en los sistemas de neurotransmisores inhibidores en la médula espinal de la lamprea de mar durante la regeneración. Estos cambios se analizaron usando técnicas de inmunofluorescencia para la visualización de los neurotransmisores GABA y glicina en las células y sus prolongaciones. Además se investigó la proporción de neuronas espinales de proyección ascendente o descendente mediante la combinación de técnicas de trazado neuronal con la detección inmunofluorescente de los neurotransmisores glicina y GABA.



MATERIAL Y MÉTODOS





MATERIAL Y MÉTODOS

Declaración ética

Todos los experimentos llevados a cabo en el presente estudio han sido aprobados por el Comité de Bioética de la Universidad de Santiago de Compostela y por la Consellería do Medio Rural e do Mar de la Xunta de Galicia (JPLV/Id) y han sido realizados de acuerdo con las directrices españolas y de la Unión Europea sobre bienestar animal y experimentación.

Individuos

Para la realización de este estudio se han empleado larvas de lamprea de mar *Petromyzon marinus* L. (n = 94). Como la edad de las larvas no es conocida y existe una relación entre la longitud corporal y la edad (Ooi y Youson, 1976, Purvis, 1979; Rubinson y Cain, 1989), en este trabajo, las larvas se caracterizaron por su longitud corporal. Para el estudio de las proyecciones rombencefálicas inhibitoras descendentes en larvas de lamprea de mar se utilizaron 10 larvas de lamprea de un tamaño comprendido entre 50 y 140 mm. Para el estudio de la respuesta aguda de los sistemas inhibitoros a la lesión medular se han utilizado 41 larvas [3 control y 41 lesionadas (0, n=8; 1, n=8; 2, n=6; 3, n=6; 4, n=5, 7, n=8 días postlesión (dpl)]. Para el estudio de los cambios en los sistemas inhibitoros durante la regeneración mediante técnicas de inmunofluorescencia se usaron 41 larvas [9 control y 32 lesionadas (0dpl, n=9 y 2, n=5; 4, n=6; 10, n=7; 24, n=5 semanas post-lesión (spl)]. Para poner de manifiesto las neuronas con proyección ascendente o descendente se usaron 2 larvas. Todas las larvas utilizadas para los estudios de la respuesta aguda a la lesión y los cambios de los sistemas de neurotransmisores inhibitoros durante la regeneración, excepto un animal de 80 mm y otro de 156 mm, tenían un tamaño corporal comprendido entre 90 y 125 mm de longitud. Las larvas fueron distribuidas al azar y homogéneamente entre los distintos tipos de experimentos. Por tanto, para las lesiones de médula espinal se utilizaron larvas maduras (de cerca de 100 mm de longitud corporal o mayores). Estas larvas tienen una edad de 5 años o más y su sistema reticuloespinal está totalmente desarrollado a lo largo de toda la médula espinal, por lo que no hay confusión entre posibles procesos de desarrollo y regeneración (Shifman y col., 2007). De hecho, la mayor parte de los estudios de regeneración espinal en lampreas se han realizado en larvas maduras.

Los animales se capturaron en el río Ulla (Galicia, noroeste de España), con el permiso de la Consellería do Medio Rural e do Mar de la Xunta de Galicia, y se mantuvieron en un acuario con sedimento de río y condiciones de temperatura y aireación adecuadas.

Cirugía

Los animales se anestesiaron profundamente mediante su inmersión en metanosulfonato de tricaína (MS-222; Sigma, St. Louis, MO) diluido en solución Ringer (pH 7.4) de composición: NaCl 137 mM, KCl 2.9 mM, CaCl₂ 2.1 mM, HEPES 2 mM. Las larvas se colocaron con el lado dorsal hacia arriba en una placa revestida de Sylgard, llena de solución Ringer. La médula espinal se expuso mediante una incisión transversal en la pared corporal a nivel de la quinta branquia. Con un bisturí se realizó una sección completa de la médula espinal, visualizando los extremos cortados de la médula bajo la lupa. Tras la cirugía, las lampreas se mantuvieron en hielo durante 1 hora para permitir que la herida se secase al aire (excepto aquellas procesadas inmediatamente después de la lesión). Durante esta hora, los animales se mantuvieron sobre una toalla de papel empapada en solución Ringer evitando el contacto directo con el hielo. Después de este tiempo, se dejó recuperar a los animales en tanques de agua dulce con aireación, a una temperatura de 19.5°C, dado que se sabe que las lampreas pueden recuperar su locomoción normal a esta temperatura (Cohen y col., 1999). Cada animal lesionado se examinó 24 horas después de la cirugía para confirmar que no era capaz de realizar movimientos caudalmente al lugar de la lesión. La sección espinal se considera completa si al estimular la cabeza, el animal sólo puede mover el cuerpo rostralmente a la lesión.

Trazado retrógrado

El trazado retrógrado se utilizó para determinar el origen de las proyecciones inhibitorias descendentes a la médula espinal y para analizar si las neuronas espinales que pierden el fenotipo inhibitorio después de una lesión medular son capaces de volver a expresar los neurotransmisores inhibitorios. En ambos casos el trazado retrógrado se combinó con inmunohistoquímica.

Para determinar el origen de las proyecciones inhibitorias descendentes se realizaron experimentos de trazado neuronal retrógrado empleando neurobiotina (NB; 322.8 Da; Vector Laboratories, Burlingame, CA) como trazador. Las larvas de lamprea se anestesiaron profundamente con benzocaína (0.05 %; Sigma, St. Louis, MO) y la médula espinal se expuso mediante una incisión realizada en la región dorsal del cuerpo a nivel de la tercera branquia. El trazador se aplicó en la médula espinal a este nivel con la ayuda de una minucia (tamaño: #000; diámetro: 0.25 mm). La incisión se selló con pegamento quirúrgico (Hystoacril, B. Braun Surgical, Melsungen, Alemania). Los animales se mantuvieron en solución Ringer con aireación, a 4° C durante 3 días para permitir el transporte de la NB desde el punto de inyección en el axón hasta el soma neuronal en el cerebro. Los tiempos de transporte utilizados se obtuvieron en base a resultados de experimentos control llevados a cabo para comprobar el tiempo de transporte óptimo para este trazador en larvas de lamprea de mar (Barreiro-Iglesias y col., 2008b).

Para poner de manifiesto las neuronas espinales con proyección ascendente o descendente se usó el mismo protocolo, pero la aplicación del trazador se realizó a nivel de la quinta branquia, en el lugar de la lesión (aplicándolo en ambos extremos cortados de la médula) y los animales se dejaron recuperar 2 semanas después de su procesamiento.

Procesamiento del tejido

Todos los animales se anestesiaron profundamente con MS-222 al 0.1% diluido en solución Ringer y se sacrificaron por decapitación.

Para los estudios histológicos se procesaron los animales control, los animales a los que se les aplicó un trazador después del tiempo de transporte del mismo, y los animales lesionados, con o sin aplicación del trazador después de los diferentes periodos de recuperación tras la lesión. La cabeza hasta la segunda branquia (en los animales destinados al estudio de las proyecciones descendentes) o la región del cuerpo comprendida entre la 4^a-6^a branquia (en los animales destinados al estudio de los cambios después de la lesión y durante la regeneración) se fijaron por inmersión en glutaraldehído al 5% y metabisulfito sódico (MB) al 1% en Tris salino (TBS; pH 7.4) durante 20 horas. Una vez fijado, el tejido se embebió en Neg 50 TM (Microm International GmbH, Walldorf, Alemania). A continuación se congeló en isopentano enfriado con nitrógeno líquido y se realizaron secciones transversales de 14 µm de grosor en un criostato, colocando los cortes en portas de vidrio Superfrost Plus ® (Menzel, Braunschweig, Alemania).

Inmunofluorescencia

La técnica de inmunofluorescencia se utilizó para poner de manifiesto la expresión de GABA y glicina. Las secciones se pretrataron con NaBH₄ 0.2 % en agua destilada durante 45 minutos a temperatura ambiente para eliminar la autofluorescencia inducida por el glutaraldehído. Las secciones se incubaron durante 3 días a 4°C en mezclas de diferentes anticuerpos: anticuerpo policlonal contra glicina obtenido en conejo (Immunosolution, Jesmond, Australia; código IG1003, lote 1953; dilución 1:3000), anticuerpo monoclonal contra GABA obtenido en ratón (Sigma; clon GB-69, No A 0310, dilución 1: 1200), anticuerpo policlonal contra GABA obtenido en conejo (Affiniti, Mamhead, UK; 1:500), anticuerpo monoclonal contra citoqueratinas (LCM29) obtenido en ratón (generosamente donado por el Dr. Selzer, Philadelphia; 1:100) o un), anticuerpo monoclonal contra HuC/HuD obtenido en ratón (Molecular Probes Europe, Leiden, The Netherlands; 1:100) (ver comentario). A continuación se incubó durante 1 hora con una mezcla de inmunoglobulina de cabra anti-conejo conjugada con Cy3 (Chemicon, Temecula, CA; 1:200) e inmunoglobulina de cabra anti-ratón conjugada con Cy5 (Chemicon; 1:100; en el estudio de las proyecciones descendentes) o conjugada con FITC (Chemicon; 1:100; en el estudio de los cambios después de la lesión y durante la regeneración). Todos los anticuerpos se diluyeron en TBS que contenía un 1% de MB, 0.2 % de Triton X-100 y un 15 % de suero normal de cabra.

Para la detección indirecta del trazador, las secciones se incubaron durante 4 horas a temperatura ambiente con fluoresceína isotiocianato (FITC)-marcada con avidina D (Vector, Burlingame, CA; 1:1000) en TBS con 0.3% Triton X-100. Las secciones se lavaron con agua destilada y se montaron con medio de montaje para fluorescencia (Vectashield; Vector).

Anticuerpos

La especificidad del anticuerpo policlonal anti-glicina se ha caracterizado con anterioridad (Villar-Cerviño y col., 2008a). El anticuerpo anti-glicina (Immunosolution) se elaboró contra tiroglobulina porcina conjugada con glicina y el proveedor lo probó en

secciones de retina y cerebelo de varios mamíferos y otros vertebrados así como en inmunoensayos dot blot con una variedad de aminoácidos encontrados en proteínas y con los aminoácidos no proteicos D-serina, D-alanina y D-aspartato; con GABA y con el tripéptido que contiene glicina, glutatión (GSH) y ninguno produjo reactividad significativa. Este anticuerpo ha sido desarrollado por Dr. David V. Pow (University of Newcastle, Newcastle, New South Wales, Australia) y utilizado en un gran número de estudios en neuronas glicinérgicas de la retina, cerebro y médula espinal. Para los controles de procesamiento de tejido, el antisuero primario se omitió en algunas secciones de tejido. No se observó tinción en estos controles. Además, se realizó Western blot con extractos de proteína de lamprea (Villar-Cerviño y col., 2006; resultados no publicados) y no se tiñó ninguna banda de proteína en estos blots.

El anticuerpo monoclonal de ratón anti-GABA se ha utilizado con anterioridad en nuestro laboratorio (Villar-Cerviño y col., 2008b). El anticuerpo se elaboró contra GABA conjugado con albúmina de suero bovina (BSA) y glutaraldehído. La actividad y especificidad fueron evaluadas por el proveedor mediante inmunoensayos dot blot. No se observó actividad cruzada con BSA, ácido L- γ -aminobutírico, ácido L-glutámico, ácido L- aspártico, glicina, ácido δ -aminovalérico, L-treonina, L-glutamina, taurina, putrescina, L-alanina o carnosina. El anticuerpo mostró una reacción cruzada débil con β -alanina. Además, las secciones de cerebro y retina de lamprea de mar incubadas con el anticuerpo revelaron el mismo patrón de marcaje revelado en con otros anticuerpos anti-GABA (Meléndez y col., 2001, 2002, 2003; Villar-Cerviño y col., 2006, 2008b; Robertson y col., 2007). La preadsorción del anticuerpo de GABA con BSA no bloqueó la inmunotinción en lamprea. No se detectó inmunorreactividad cuando el anticuerpo primario fue omitido en el procedimiento inmunohistoquímico. Además, se realizó Western blot con extractos de proteínas de cerebro de lamprea (resultados no publicados) y no se tiñó ninguna banda de proteína en estos blots.

La especificidad del anticuerpo policlonal anti-GABA ha sido caracterizada por el proveedor mediante ELISA contra conjugados de BSA- glutaraldehído. Este anticuerpo ha sido utilizado en estudios previos de lamprea (Meléndez-Ferro y col., 2002; Villar-Cerviño y col., 2006).

Además, mediante Western blot de extractos de proteína de cerebro de lamprea se comprobó que los anticuerpos anti-glicina, policlonal anti-GABA y monoclonal anti-GABA no reconocen ninguna proteína nativa del cerebro de la lamprea (Villar-Cerviño y col., 2006).

El anticuerpo monoclonal de ratón anti-citoqueratinas (LCM 29) es un anticuerpo específico de lamprea que ha sido previamente caracterizado (Merrick y col., 1995) y usado en estudios de médula espinal de lampreas (Lurie y col., 1994; Uematsu y col., 2004; Vidal Pizarro y col., 2004).

El anticuerpo monoclonal de ratón anti-HuC/HuD se desarrolló contra las proteínas neuronales humanas HuC y HuD que se unen específicamente a antígenos presentes exclusivamente en neuronas y es, por tanto, utilizado como marcador neuronal. También ha sido utilizado en lampreas como marcador neuronal (Zhang y col., 2014).

Adquisición y análisis de imágenes

Las secciones se fotografiaron con microscopios confocales espectrales TCS-SP2 o SP5 (Leica, Wetzlar, Alemania). Las series de fotografías se analizaron y procesaron con los softwares LITE y LAS (Leica). Se ajustó ligeramente el brillo y el contraste de las fotografías con el software Adobe Photoshop CS4 (Adobe Systems, San José, CA).

En el estudio de las proyecciones inhibitoras descendentes, para asegurar la existencia de colocación de GABA y glicina en la misma neurona, se consideraron sólo las neuronas inmunorreactivas a glicina (glicina-ir) e inmunorreactivas a GABA (GABA-ir) claramente teñidas y detectadas en proyecciones de secciones ópticas de 2-4 μm de grosor de las series obtenidas con un microscopio confocal. Las neuronas teñidas débilmente o que podrían contener niveles mínimos de glicina o GABA no se tuvieron en cuenta.

En el estudio de los cambios agudos en respuesta a la lesión, en larvas procesadas entre 1 y 3 días después de la lesión (n=20) se observó la presencia de acumulaciones de neurotransmisores inhibitorios, a los que denominamos halos, alrededor de algunos axones descendentes. Para calcular el porcentaje de axones con halos de glicina o GABA, de cada animal se fotografiaron 10 secciones alternativas de las primeras 300 micras rostrales al lugar de la lesión.

Para la cuantificación de células doblemente marcadas con neurobiotina y glicina o GABA se fotografiaron una de cada tres secciones consecutivas entre las 150 y las 400 micras rostrales y caudales al lugar de la lesión en 2 individuos diferentes, procesados dos semanas después de la lesión.

Para la cuantificación de los cambios en los sistemas inhibitorios durante la regeneración, en los animales control, se fotografiaron diez secciones al nivel de la quinta branquia y en los animales lesionados, se fotografiaron 1 de cada 3 secciones de médula espinal en las primeras 300 (glicina) o 400 (GABA) μm rostrales y caudales al lugar de la lesión.

Para la cuantificación de los cambios en los sistemas inhibitorios durante la regeneración las fotografías se realizaron con un aumento 20x y un zoom de 2, sin variar los parámetros de ganancia y offset para evitar la introducción de variabilidad experimental. Las series de fotografías se procesaron con los softwares LCS Lite y LAS (Leica) para realizar una proyección en Z de la serie, generando un archivo tiff de las microfotografías. El contraste y el brillo se ajustaron mínimamente con el software Fiji (Image J, NIH, Bethesda, Maryland, USA). Las figuras se hicieron usando Adobe Photoshop CS4 (Adobe Systems). Los esquemas se realizaron con Corel Suite X5 (Corel, Ottawa, Canada).

Medidas y cuantificaciones

El número de células teñidas por dos o tres marcadores en los experimentos que combinan trazador e inmunohistoquímica se obtuvo a partir de secciones seriadas de cuatro larvas en las que el transporte de neurobiotina había sido exitoso, en base al marcaje de las neuronas reticuloespinales, y en las que las células glicinérgicas y GABAérgicas estaban bien teñidas. Los diámetros transversales de las células se midieron en las microfotografías

confocales empleando el software LITE (Leica). Se midieron diez células de cada población. Los valores se expresaron como medias del diámetro menor \pm desviación estándar (SD).

En todas las cuantificaciones realizadas para la detección de cambios, el experimentador no conocía la identidad de las muestras.

En el estudio de los cambios agudos en respuesta a la lesión se calculó el porcentaje de halos de glicina o GABA a partir de contajes realizados en las larvas procesadas entre 1 y 3 dpl ($n = 20$). Se analizaron los fascículos dorsal, lateral y longitudinal medial y los axones de las neuronas de Mauthner en 10 secciones alternas de 14 μm en las primeras 300 μm rostrales al lugar de la lesión, en cada animal. El porcentaje de halos por fascículo o por axón de Mauthner se calculó en base al número total de los axones de los fascículos o de los axones de Mauthner (14 axones en el fascículo dorsal, 12 axones en el fascículo lateral, 18 axones en el fascículo longitudinal medial y 2 axones de Mauthner). Los porcentajes finales se expresaron como media \pm el error estándar de la media (SEM) a partir de los datos de los 20 animales.

Para el estudio de los cambios durante la regeneración se cuantificaron tres tipos de neuronas glicinérgicas y tres tipos de neuronas GABAérgicas (dorsales, laterales y células CSF_c) en una mitad de la médula. Los contajes se realizaron por el investigador a partir de las series de fotografías. El número de células en las 300 (glicina) o 400 (GABA) micras se estimó a partir del número de células contadas en cada sección y para cada tipo celular y animal se calcularon las medias correspondientes a las regiones rostral y caudal.

El número de prolongaciones (perfiles) que expresan glicina y GABA se cuantificó usando el software Fiji, siguiendo el protocolo descrito por Fernández-López y col. (2014a). Brevemente, la médula espinal se ha dividido en tres regiones, dorsomedial (DM), ventromedial (VM) y lateral (Lat) y se contaron los perfiles en cada una de ellas en una mitad de la médula. Para obtener una imagen más precisa, disminuyendo el fondo e incrementando la forma y perfil de las prolongaciones, se estableció un valor umbral. Para ello, antes de proceder a la cuantificación, se tomaron 10 imágenes al azar con diferentes densidades de perfiles y se seleccionó el valor umbral óptimo. Una vez establecido, el mismo valor umbral se aplicó a todas las fotografías.

El porcentaje de células doblemente marcadas con neurobiotina y glicina o GABA se realizó por el investigador a partir de las series de fotografías. Únicamente se consideraron aquellas que mostraron una colocalización clara en las series de proyecciones ópticas obtenidas con el microscopio de barrido confocal.

Análisis estadísticos

Los análisis estadísticos se llevaron a cabo con el programa Prism 6 (GraphPad software, La Jolla, CA).

En el estudio de los cambios agudos después de la lesión se analizó la correlación (test de Pearson) entre la presencia de halos de neurotransmisores inhibidores y la capacidad de supervivencia de los axones descendentes de cada fascículo [ver Shifman y col., 2008: fascículo dorsal (95,7%), fascículo lateral (94,5%), fascículo longitudinal medial (56,7%), y axones de Mauthner (29%)].

En el estudio de los cambios durante la regeneración se utilizaron los Tests Kolmogorov-Smirnov o D'Agostino y Pearson para comprobar la normalidad de los datos. La homocedasticidad se determinó mediante el test Brown-Forsythe. Los datos que mostraron homocedasticidad y una distribución normal se analizaron mediante ANOVA de una vía, seguido del test de comparaciones múltiples post-hoc de Dunnett. Los datos que no mostraron una distribución normal se analizaron mediante el test de Kruskal-Wallis y el test de comparaciones múltiples post-hoc de Dunn. El nivel de significación se estableció en 0.05. Los datos se presentan como media \pm error estándar de la media (SEM). En las figuras, los diferentes niveles de significación se representan con diferente número de asteriscos. Los asteriscos indican diferencias significativas (*: $0,01 < \text{valor } p < 0,05$; **: $0,001 < \text{valor } p < 0,01$; ***: $0,0001 < \text{valor } p < 0,001$; ****: $\text{valor } p < 0,0001$).

Terminología

Para las diferentes poblaciones glicinérgicas y GABAérgicas se utilizó la misma terminología empleada en estudios previos de nuestro grupo (glicina: Villar-Cerviño y col., 2008a, 2009; GABA: Meléndez-Ferro y col., 2003). Para la formación reticular, se adoptó la clasificación utilizada generalmente de núcleo reticular rombencefálico anterior (ARRN), medial (MRRN) y posterior (PRRN), basada en la distribución de las células grandes (Rovainen, 1967; Nieuwenhuys, 1972), aunque Villar-Cerviño y col. (2008a, 2009) dividieron la formación reticular en cuatro regiones: ístmica, del trigémino, del octavo y posterior, siguiendo la clasificación de Stefanelli (1934), ya que se ajustaba mejor al estudio de las poblaciones reticulares glicinérgicas de células pequeñas. La correspondencia entre las regiones de Stefanelli y Nieuwenhuys es: la región ístmica incluye la zona rostral del ARRN, la del trigémino incluye las células de Müller I3 e I4 y la región rostral del MRRN, la región del octavo incluye las células más grandes del MRRN y las células de Mauthner anterior y posterior y, finalmente, la región posterior coincide con el PRRN.



ABREVIATURAS





Abreviaturas

ARRN	núcleo rombencefálico reticular anterior
CSF-c	células licuorcontactantes
DC	columna dorsal
DCN	núcleo de la columna dorsal
DN	núcleo dorsal del área octavolateral dorsal
DM	dorsomedial
Dpl	días post-lesión
dV	raíz descendente del nervio trigémino
DTh	tálamo dorsal
GLY	glicina
Hy	hipotálamo
Is	istmo
IX	núcleo motor glossofaríngeo
LAT	lateral
LP	palio lateral
M	mesencéfalo
MN	núcleo medial del área octavolateral
MO	bulbo raquídeo
MRRN	núcleo rombencefálico reticular medial
OB	bulbo olfatorio
OLA	área octavolateral
Pt	área pretectal
PRRN	núcleo rombencefálico reticular posterior
SC	medulla espinal

Spl	semana post-lesión
VId	subnúcleo abducens dorsal (rectus ventral)
VIIIm	núcleo motor facial
VIv	subnúcleo abducens ventral (rectus caudal)
Vm	núcleo motor trigeminal
VM	ventromedial
VN	núcleo ventral del área octavolateral nucleus
Xm	núcleo motor vagal





RESULTADOS



RESULTADOS

Proyecciones Rombencefálicas Inhibidoras Descendentes en larvas de Lamprea de mar

En la primera investigación se ha estudiado por primera vez el origen de las proyecciones rombencefálicas inhibidoras descendentes a la médula espinal en la lamprea de mar utilizando métodos de trazado neuronal e inmunofluorescencia.

Consideraciones metodológicas

En estudios experimentales previos se ha observado una gran variabilidad en el número de células marcadas en las diferentes poblaciones neuronales que proyectan a la médula espinal (Swain y col., 1993). La variabilidad de los resultados experimentales se debe a la captación de trazadores neuronales en la médula espinal sugiriendo que el procedimiento experimental no demuestra completamente la población real de las neuronas aferentes. A pesar de esto, los resultados de este estudio demuestran claramente la existencia de proyecciones reticuloespinales inhibidoras en lampreas y pueden considerarse representativos de la organización de este sistema.

Organización general de las proyecciones rombencefálicas inhibidoras descendentes

El patrón de expresión de células glicina-inmunoreactivas (-ir) en el cerebro y médula espinal de la lamprea observado en nuestras preparaciones coincide con el descrito previamente (Villar-Cerviño y col., 2008a, 2009). Asimismo, el patrón de expresión de las células GABA-inmunoreactivas (-ir) coincide con el descrito en estudios previos (Meléndez-Ferro y col., 2003; Robertson y col., 2007). Tras la aplicación del trazador en la médula espinal, se observaron neuronas glicina-ir/GABA-negativas que proyectan a la médula espinal en tres núcleos rombencefálicos: los núcleos reticulares anterior, medial y posterior y neuronas GABA-ir/glicina-negativas con proyección espinal en los núcleos reticulares anterior y posterior. También se observaron algunas neuronas glicina-ir/GABA-ir en el núcleo reticular posterior pero la mayoría de las neuronas glicina-ir que proyectan a la médula espinal no mostraron inmunoreactividad a GABA, del mismo modo, la mayoría de las células GABA-ir no mostraron inmunoreactividad a glicina. En la figura 1 se muestra la organización de las neuronas inhibidoras de proyección espinal.

Núcleo rombencefálico reticular anterior (ARRN)

El núcleo rombencefálico reticular anterior se extiende desde la región ístmica hasta sobrepasar la región localizada a nivel del núcleo motor del nervio trigémino. En esta región se localizan cuatro células de Müller (I1-I4) pertenecientes al grupo celular ístmico. Villar-Cerviño y col., (2008; 2009) diferencian dos poblaciones glicina-ir en el ARRN. La región ístmica, en la región reticular intermedioventral y la región trigeminal, localizada en la zona medial de la placa basal caudalmente al istmo y ventromedialmente al núcleo motor del nervio trigémino.

En el núcleo rombencefálico reticular anterior se observaron dos poblaciones de neuronas inhibitoras, una formada por células doblemente marcadas con NB y glicina y otra formada por células marcadas con NB y GABA. Además hay células marcadas con NB que no tienen glicina ni GABA, así como neuronas glicina-ir y GABA-ir que no tienen proyección espinal. Las células glicina-ir observadas se localizan en la región caudal del núcleo rombencefálico reticular anterior a nivel del núcleo motor del trigémino. Por su posición este grupo de neuronas pertenece a la población glicina-ir reticular trigeminal previamente descrita por Villar-Cerviño y col. (2008; 2009). Estas neuronas ($8.25 \pm 0.48 \mu\text{m}$ de diámetro menor; ver tabla 1), poseen un pericarion fusiforme y dendritas que se extienden lateralmente (Fig. 8A). En esta región el número de células glicina-ir con proyección espinal observado fue bajo.

En el ARRN también se observaron escasas células GABA-ir con proyección descendente. Las células observadas pertenecen a la población GABA-ir localizada a nivel ístmico descrita previamente por Meléndez-Ferro y col. (2003) y Robertson y col. (2007) en el ARRN. Estas células (8.75 ± 0.81 de diámetro menor; ver tabla 1) presentan soma redondeado (Fig. 8B). En todos los ejemplares estudiados el número de células glicina-ir fue mayor que el de células GABA-ir.

Núcleo rombencefálico reticular medial (MRRN)

El núcleo reticular medial se localiza a nivel de los núcleos motores de los nervios facial y octavolateral y caudalmente al núcleo motor trigeminal. Está formado por un gran número de neuronas reticulares entre las que se encuentra la célula de Mauthner, localizada lateralmente y cinco células de Müller (B1-B5). Además, en esta región pueden observarse células más pequeñas con proyección espinal así como numerosas células que no proyectan a la médula.

A nivel del MRRN se observaron células doblemente marcadas con NB y glicina. Sin embargo, no se encontraron células GABA-ir con proyección espinal en las muestras analizadas. En este núcleo, las células reticuloespinales de mayor tamaño (células de Mauthner y de Müller) son glicina-negativas/GABA-negativas, pero hay algunas células glicina-ir/GABA-negativas de proyección descendente con soma redondo (Fig. 8C) ($9.58 \pm 2.09 \mu\text{m}$ de diámetro menor; ver tabla 1). Estas células son de mayor tamaño que las células glicina-ir que no proyectan a la médula espinal y pertenecen a la población glicina-ir descrita anteriormente por Villar-Cerviño y col. (2008, 2009) en el MRRN ventralmente al núcleo motor del nervio facial. El número de estas células es bajo.

Núcleo rombencefálico reticular posterior (PRRN)

La formación rombencefálica reticular posterior de las larvas de lamprea de mar se encuentra a nivel de la placa basal a nivel del núcleo motor de los nervios glossofaríngeo y vago. En esta región se pueden observar neuronas densamente empaquetadas que se extienden caudalmente hasta el óbex, esto es, hasta la zona de transición rombencéfalo-médula espinal. Esta región consta de una parte lateral y otra medial. En la parte medial se localizan células reticulares grandes pero también una población constituida por numerosas células de tamaño medio y pequeño. Las células de pequeño tamaño son más abundantes que las de tamaño mediano. En la parte lateral de este núcleo reticular también pueden observarse algunas células de diferente tamaño: pequeñas, medianas y en menor medida grandes. Al igual que en la formación rombencefálica reticular medial, las células de mayor tamaño son glicina-negativas/GABA-negativas.

En el núcleo reticular rombencefálico posterior las células inhibitoras se sitúan medialmente, es decir en las capas periventriculares. En todos los ejemplares estudiados su número fue mayor que el de las situadas en los núcleos reticulares más rostrales, pero como en ellos aparecen mezcladas con otras células de proyección espinal. Las células inhibitoras presentan una morfología variable pudiéndose encontrar células redondas, fusiformes o multipolares. En esta región rombencefálica atendiendo a su inmunoreactividad se pudieron diferenciar tres poblaciones inhibitoras con proyección espinal diferentes: neuronas glicina-ir/GABA negativas ($8.91 \pm 3.29 \mu\text{m}$ de diámetro menor; ver tabla 1), neuronas GABA-ir/glicina negativas ($7.19 \pm 1.05 \mu\text{m}$ de diámetro menor; ver tabla 1) y neuronas glicina-ir/GABA-ir ($10.82 \pm 2.72 \mu\text{m}$ de diámetro menor; ver tabla 1). Las células glicina-ir son más abundante que las GABA-ir y las glicina-ir/GABA-ir. Además hay neuronas glicinérgicas y GABAérgicas que no están marcadas con NB.

Las células glicina-ir pertenecen a la población descrita por Villar-Cerviño y col. (2009) en larvas de lamprea de mar, localizada en el PRRN medial a nivel ventral a los núcleos motores de los nervios glossofaríngeo-vago (Fig. 6A, 3B). La población GABA-ir pertenece a la observada en estudios anteriores por Meléndez-Ferro y col. (2003) y Robertson y col. (2007) (Fig. 6A, 3C) en esta región.

FIGURAS

Tabla 1. Tamaño medio de las células inhibitoras descendentes de los núcleos reticulares rombencefálicos de larvas de lamprea de mar, tomando como referencia el diámetro menor de las mismas



TABLA 1

ARRN	
Células descendentes glicina-ir	8.25 ± 1.48
Células descendentes GABA-ir	8.75 ± 0.81
MRRN	
Células descendentes glicina-ir	9.58 ± 2.09
PRRN	
Células descendentes glicine-ir	8.91 ± 3.29
Células descendentes GABA-ir	7.19 ± 1.05
Células descendentes glicina-ir/GABA-ir	10.82 ± 2.72

Están representados los valores medios para cada núcleo reticular rombencefálico.

Figura 1. Representación esquemática de secciones transversales del rombencéfalo de una larva de lamprea de mar en la que se muestra la distribución de las células descendentes glicina-ir y /o GABA-ir (derecha) y las principales estructuras cerebrales (izquierda). A-C: Rombencéfalo. El nivel de las secciones se indica arriba a la derecha. La correspondencia con las microfotografías en otras figuras se indica en los recuadros. Barra de calibrado: 50 μ m.



FIGURA 1

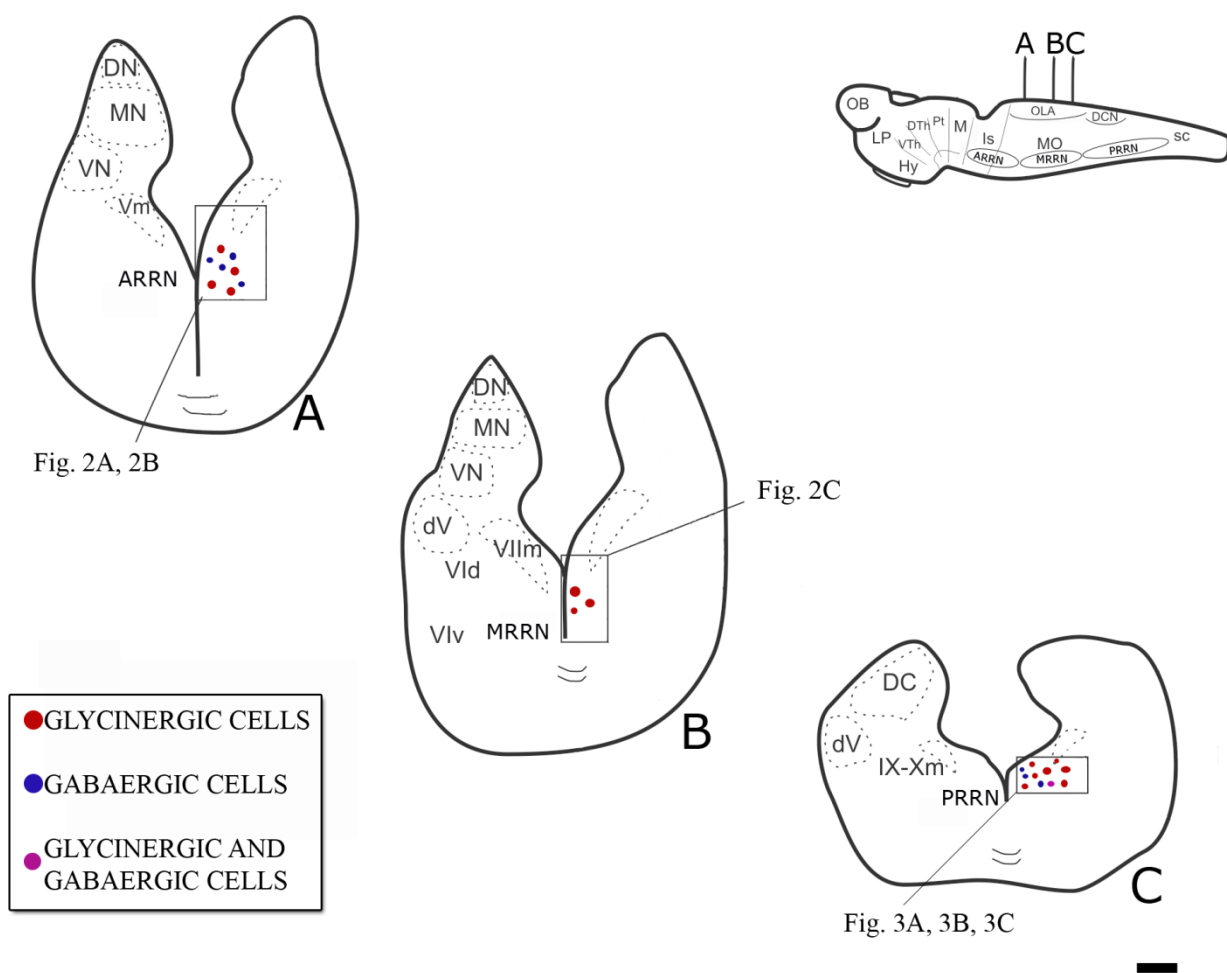


Figura 2. Microfotografías confocales de secciones del rombencéfalo de la lamprea de mar de ejemplares a los que se aplicó NB (canal verde) en la médula espinal rostral e inmunohistoquímica para glicina (canal rojo) y GABA (canal azul). Las flechas indican las células con marcaje doble. La región dorsal se localiza arriba. (A–A'') Microfotografías de una sección transversal del rombencéfalo a nivel del núcleo rombencefálico reticular anterior (ARRN) en las que se muestran células glicina-ir también marcadas con el trazador NB. (B–B'') Microfotografías de una sección transversal del rombencéfalo a nivel del núcleo rombencefálico reticular anterior (ARRN) en las que se muestran células GABA-ir también marcadas con NB. (C–C'') Microfotografías de una sección transversal del rombencéfalo a nivel del núcleo rombencefálico reticular medial (MRRN) en las que se muestran células glicina-ir también marcadas con NB. Barras de calibrado: 75 μm in (A–A'', B–B'') y 50 μm in (C–C'').



FIGURA 2

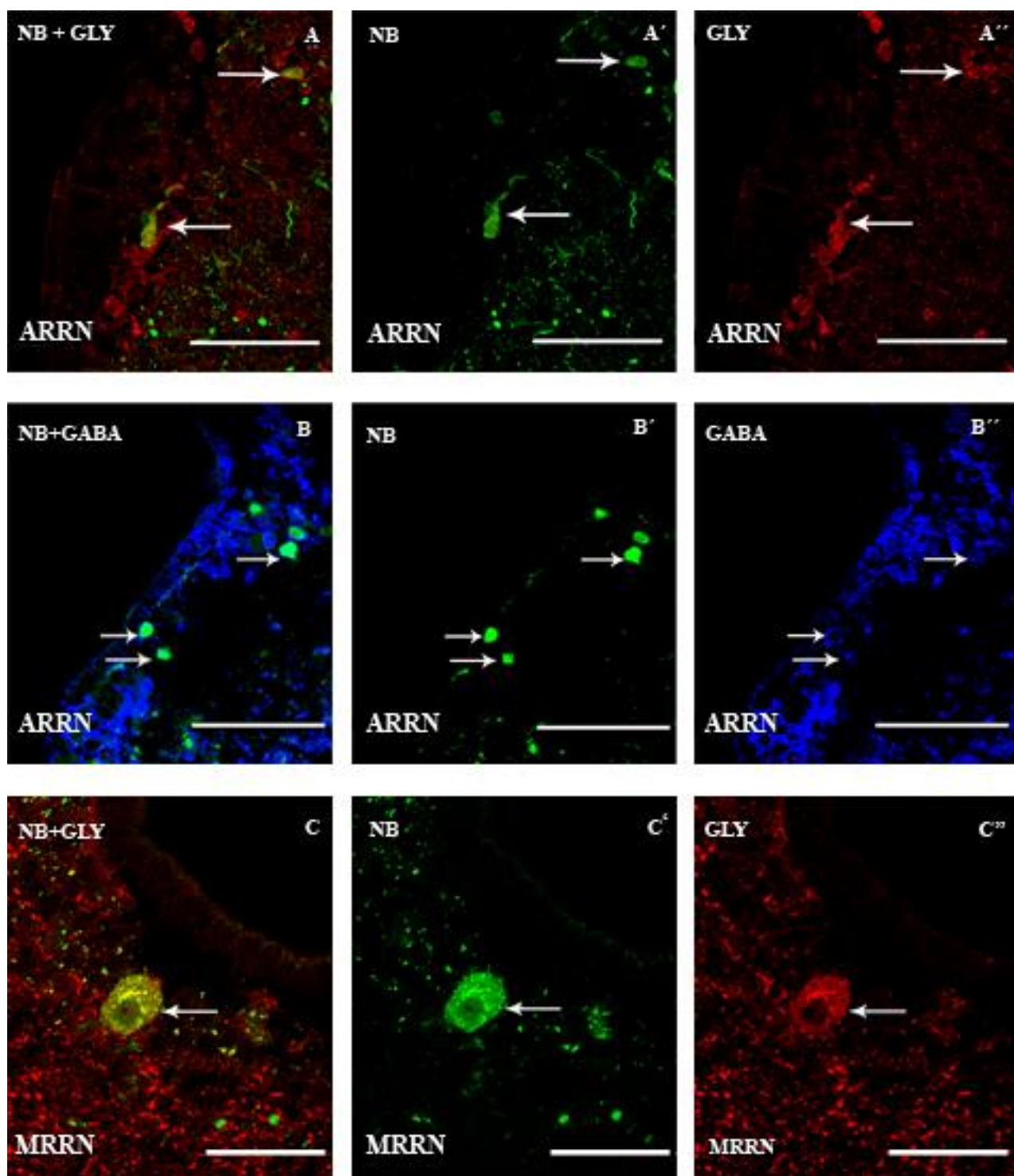
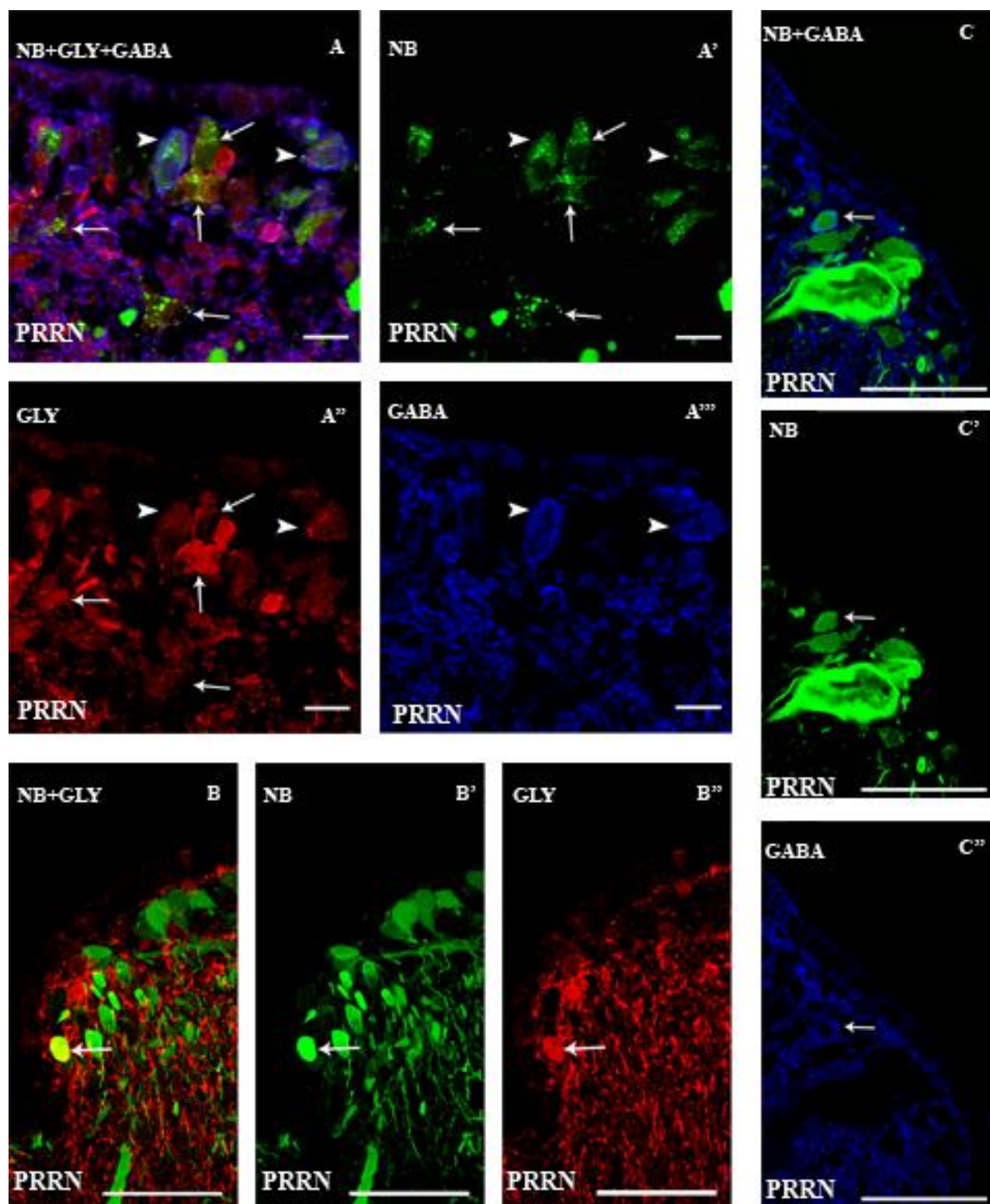


Figura 3. Microfotografías confocales de la combinación de los experimentos de trazado neuronal e inmunohistoquímica para glicina y GABA de secciones transversales del rombencéfalo a nivel del núcleo rombencefálico reticular posterior (PRRN). Código de colores como en la figura 2. Obsérvense células con marcaje doble, glicina y NB (flechas; A-A'', B- B''); GABA y NB (flechas; C- C''); y neuronas con marcaje triple de glicina, GABA y NB (cabezas de flecha; A-A'''). Barras de calibrado: 75 μm in (A-A''') and 50 μm en (B-B'', C-C'').



FIGURA 3





Cambios en los sistemas de neurotransmisores inhibidores en respuesta a una lesión medular en lamprea de mar.

En larvas control de lamprea de mar, aquellas que no han sido lesionadas, a nivel de la quinta branquia la médula espinal es aplanada y el perfil del canal central es redondeado y regular. A partir de 4 dpl, se observan cambios morfológicos en el canal central. Así, en las primeras 400 - 600 μm rostrales y caudales al lugar de la lesión de los ejemplares lesionados, el canal central aumenta de tamaño y adquiere un perfil irregular, lo que concuerda con las descripciones realizadas en estudios previos (Selzer, 1978).

La expresión de GABA y glicina en las células de la médula espinal de la lamprea de mar se ha descrito con anterioridad [GABA (Batueva y col., 1990; Brodin y col., 1990; Meléndez-Ferro y col., 2003; Ruiz y col., 2004; Robertson y col., 2007), glicina (Gustafsson y col., 20002; Shupliakov y col., 1996; Villar-Cerviño y col., 2008b) y se puede observar en la Fig. 7. Brevemente, en las larvas de lamprea de mar control se han observado células glicinérgicas (Fig. 7A) y GABAérgicas (Fig. 7B) en las poblaciones lateral (Fig. 7C, G) y dorsal (Fig. 7D, G) de la sustancia gris y en células que contactan con el líquido cerebroespinal (CSFc) (Fig. 7E, F). Las células del borde ventrales son también glicinérgicas. De acuerdo con lo descrito anteriormente, se ha observado colocalización de glicina y GABA (Villar-Cerviño y col., 2008b) en algunas células de estas poblaciones (datos no mostrados).

La figura 5 muestra la colocalización de los neurotransmisores aminoacidérgicos inhibidores con Hu (marcador neuronal) (Fig. 8A-B'') y la ausencia de colocalización de estos neurotransmisores con citoqueratinas (marcador de astrocitos en lamprea) (Fig. 8C-D'') en los animales control. Esto indica que los astrocitos en animales control probablemente presentan niveles muy bajos de estos neurotransmisores, lo que no permite su observación con anticuerpos.

La lesión de la médula espinal produce un claro descenso en la expresión de glicina y GABA en las neuronas y su acumulación en los astrocitos de las regiones adyacentes a la de la lesión. La inmunorreactividad a GABA y glicina se mantiene progresivamente en neuronas cada vez más distales a la región de la lesión. Los cambios observados durante la primera semana tras la sección completa de la médula espinal se muestran en las Figuras 6, 7, 8 y 9.

Respuesta neuronal y astrocítica inmediatamente después de la lesión

A 0 dpl (inmediatamente después de la lesión), en las primeras 300 μm rostrales y caudales a la lesión, las neuronas y las prolongaciones neuronales no muestran inmunorreactividad a glicina, mientras que sí se observa en los astrocitos una inmunorreactividad intensa (Fig. 6A-A''). Después de estas 300 μm , se mantiene la inmunorreactividad a glicina en las neuronas y en las prolongaciones neuronales. Entre 300-350 μm desde el lugar de la lesión, se observa inmunorreactividad a glicina tanto en neuronas como en astrocitos, en la misma sección espinal (Fig. 6C-C''). Las poblaciones glicinérgicas de la sustancia gris (dorsomedial, lateral y CSFc) y de la sustancia blanca (células del borde ventrales) se observan claramente a partir de 350 μm desde el lugar de la lesión.

A 0 dpl, en las primeras 400 μm rostrales y caudales al lugar de la lesión la mayoría de las poblaciones y prolongaciones neuronales no muestran inmunorreactividad a GABA, pero sí la muestran los astrocitos (Fig. 6B-B''). Además, se ha observado colocación de GABA y glicina en los astrocitos. El único tipo neuronal que mantiene la inmunorreactividad a GABA en las regiones rostral y caudal adyacentes a la lesión son las células CSFc. Sus prolongaciones apicales aparecen aplanadas y son fuertemente inmunorreactivas en estas primeras micras desde el lugar de la lesión. Además, parecen estar revistiendo el canal central (Fig. 7A). El neuropilo marginal, que está formado por las prolongaciones de las células CSFc, también continúa siendo inmunorreactivo a GABA tras la lesión (Fig. 7B). Es necesario destacar que, a diferencia de lo que ocurre con las células CSFc GABAérgicas, las células CSFc glicinérgicas pierden su inmunorreactividad tras la lesión. Más allá de las 400 μm desde el lugar de la lesión, otros cuerpos neuronales y prolongaciones (además de las células CSFc) mantienen la inmunorreactividad a GABA. Entre las 400 y las 450 μm desde el lugar de la lesión, se observan astrocitos y neuronas inmunorreactivos a GABA en la misma sección de médula espinal (Fig. 7C-C''). Entre 400 y 600 μm desde el lugar de la lesión, la inmunorreactividad a GABA en las prolongaciones y las poblaciones celulares dorsal y lateral de la sustancia gris es ligeramente inferior a la de las muestras control. A partir de 600 μm desde el lugar de la lesión, el patrón de inmunorreactividad es similar al observado en las larvas control, en las que todas las poblaciones celulares GABAérgicas son inmunorreactivas a GABA.

Respuesta neuronal y astrocítica durante la primera semana después de la lesión

Se observa inmunorreactividad a glicina en los astrocitos hasta 1 dpl (Fig. 7D-D''). Sin embargo, en las larvas procesadas entre 2 y 7 dpl, los astrocitos no muestran inmunorreactividad a glicina. En las primeras 300 μm desde el lugar de la lesión, entre 1 y 3 dpl, parece que la glicina se acumula progresivamente formando halos alrededor de los axones descendentes del fascículo dorsal (8.8 % de axones con halos), lateral (10.1% de axones con halos) y, ocasionalmente, alrededor de uno de los axones gigantes que forman parte del fascículo longitudinal medial (3.8 % de los axones con halos) o alrededor del axón de Mauthner (7.7 % de los axones de Mauthner con halos) (Fig. 8A, B, 9A). Estos halos no muestran inmunorreactividad a citoqueratinas. La presencia de halos de glicina no se correlaciona significativamente con la capacidad de supervivencia de las neuronas que dan origen a los axones a los que rodean (Fig. 9C). A partir de las 300 μm desde el lugar de la lesión en larvas procesadas entre 1 y 4 dpl se observa un patrón de inmunorreactividad a glicina similar al de las larvas control. Este patrón se observa ya a partir de las 80 μm desde el lugar de la lesión en las larvas procesadas 7 dpl.

Con la excepción de las células CSFc, que son inmunorreactivas a GABA, entre 1 y 4 dpl, ninguna otra neurona presenta inmunorreactividad a GABA en las primeras 100 a 150 μm desde el lugar de la lesión. 1 dpl se observa inmunorreactividad a GABA en las prolongaciones de los astrocitos situadas en las primeras 80 μm desde el lugar de la lesión. De 2 a 7 dpl, no se observa inmunorreactividad a GABA en los astrocitos. Al igual que para la glicina, se encuentran halos inmunorreactivos a GABA y negativos a citoqueratinas alrededor de los axones descendentes (5.2 % de los axones del fascículo dorsal, 3.2 % de los axones del fascículo lateral, 0.8 % de los axones gigantes del fascículo longitudinal medial y 0% de los axones de Mauthner) (Fig. 8C, 9B). En este caso, se ha detectado una correlación entre la

presencia de halos inmunorreactivos a GABA alrededor de los axones reticuloespinales y la capacidad de supervivencia de las neuronas de origen de dichos axones, determinada por Shifman y col. (2008) (Coeficiente de correlación de Pearson, $r= 0.92$, $P<0.05$; Fig. 9C). A los 7 dpl, el patrón de expresión de GABA es similar al de las larvas control desde las primeras 100-140 μm desde el lugar de la lesión.



FIGURAS

Figura 4. Microfotografías de secciones transversales de la médula espinal de lamprea de mar mostrando inmunorreactividad a GABA y glicina (GLY) en animales control. A: inmunorreactividad a glicina. B: inmunorreactividad a GABA. C-E: Detalles de neuronas glicinérgicas. F-G: Detalles de neuronas GABAérgicas. En todas las figuras la región dorsal está hacia arriba. Células de la población dorsal (punta de flecha); células de la población lateral (flechas rellenas); células que contactan con el líquido cerebroespinal (CSFc) (flechas delineadas). En las figuras C, D y G la región lateral está a la izquierda. Barras de calibrado = 75µm (A y B); 15 µm (C- G).



FIGURA 4

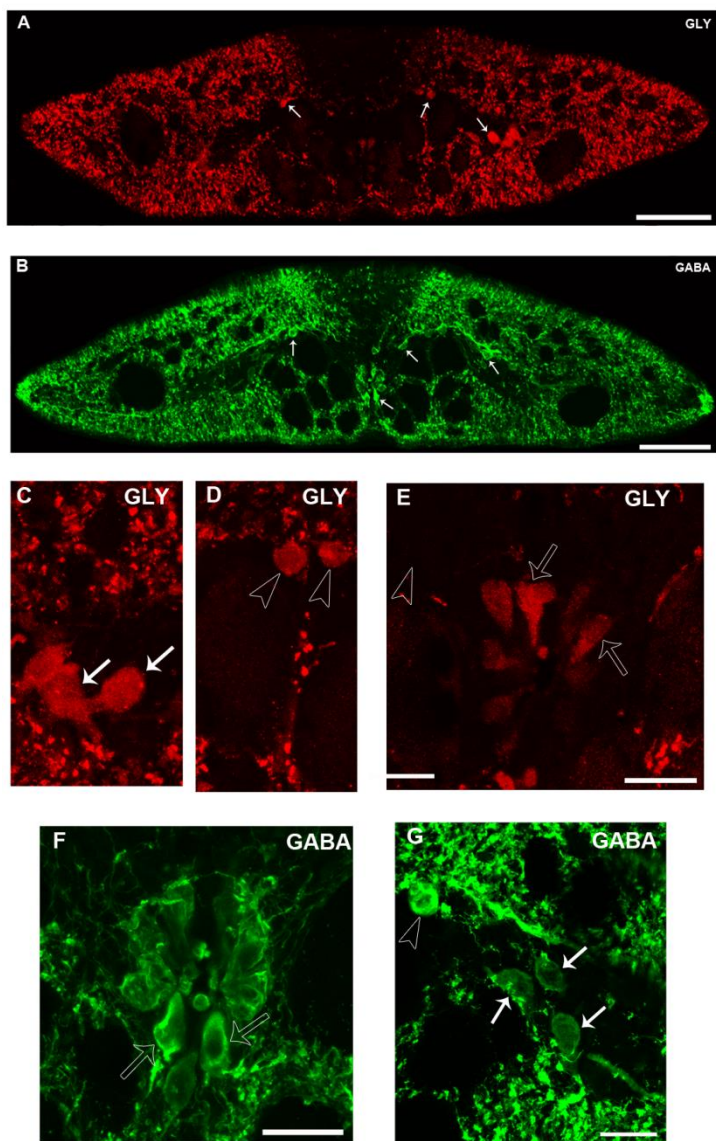


Figura 5.- A-A'', B-B'' Microfotografías que muestran detalles de neuronas (cabezas de flechas) doblemente inmunorreactivas a glicina (GLY) (A- A') o GABA (B- B') y Hu A,A'', B,B''. Las flechas señalan neuronas sólo inmunorreactivas a Hu. **C-C'', D-D''** Microfotografías mostrando neuronas inmunorreactivas a glicina (flechas, C-C') o GABA (flechas, D-D') y astrocitos inmunorreactivos a citoqueratinas (CK) (puntas de flecha, C,C'', D,D''). En todas las figuras dorsal es arriba y lateral a la derecha. Barras de calibrado: 25 μ m (B-B''); 20 μ m (A-A'', C-D'').



FIGURA 5

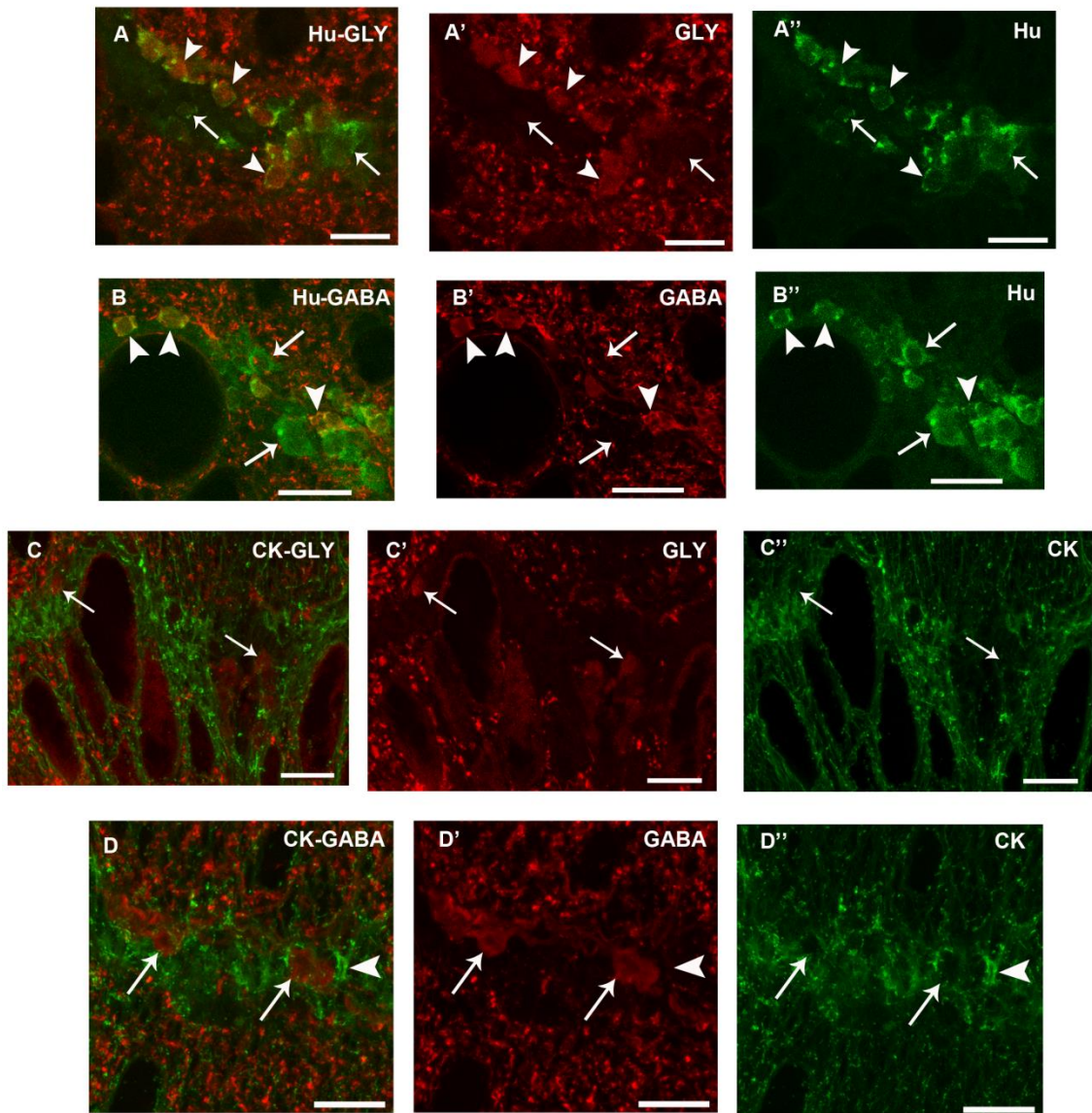


Figura 6.- Microfotografías de secciones transversales de la médula espinal que muestran detalles de astrocitos (puntas de flecha) doblemente marcados para glicina (GLY) y citoqueratinas (CK) **A-A'**, **C-C''** y para GABA y citoqueratinas **B, B''** en larvas procesadas inmediatamente después de la lesión. Las flechas en C-C'' señalan neuronas glicinérgicas. En todas las figuras dorsal está arriba y lateral a la derecha. Barras de calibrado: 20 μ m.



FIGURA 6

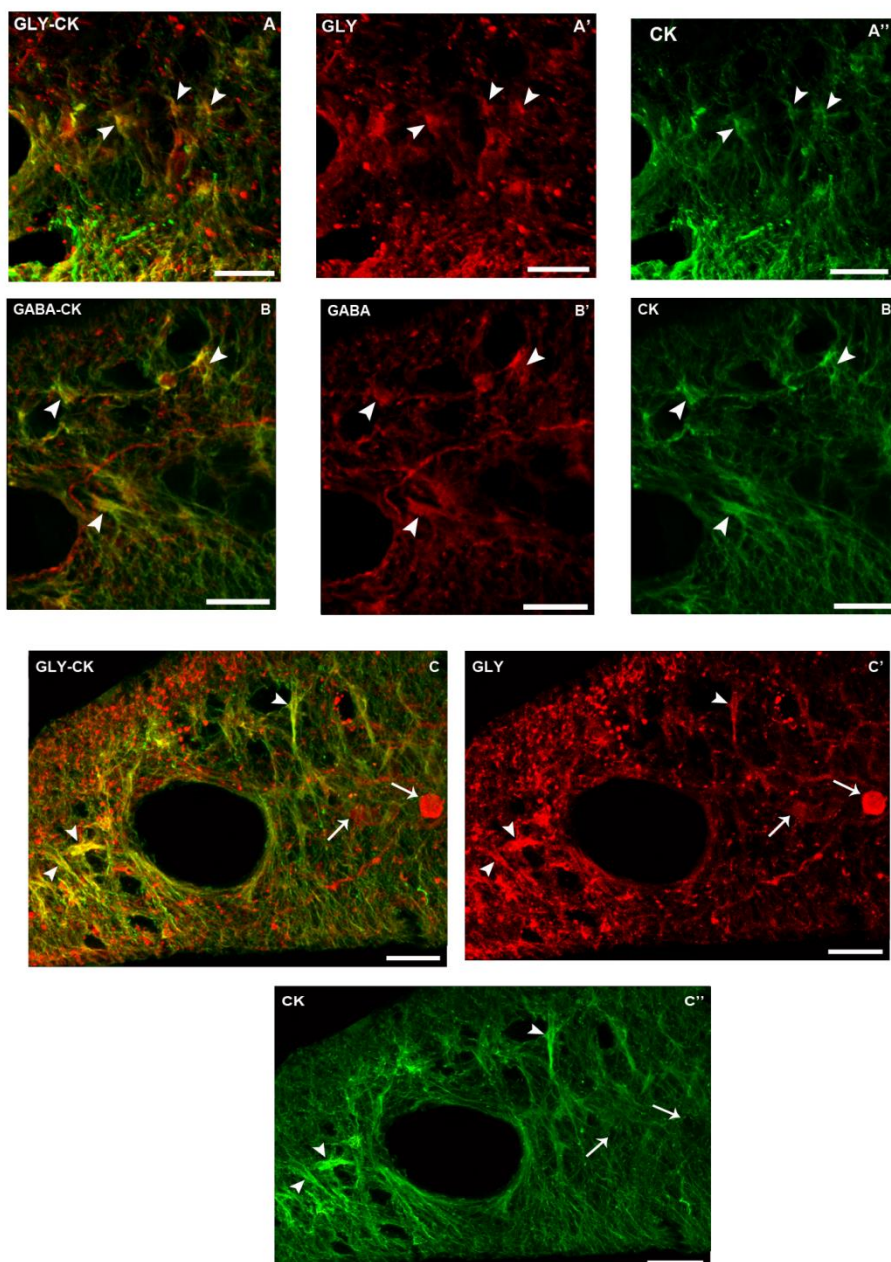


Figura 7.- Microfotografías de secciones transversales de la médula espinal mostrando detalles de inmunorreactividad a GABA y astrocitos (puntas de flecha) doblemente marcados para glicina (GLY) o GABA y citoqueratinas (CK). **A:** Células CSF-c GABAérgicas. Las puntas de flecha señalan a los procesos apicales aplanados. La estrella indica el canal central. **B:** Inmunorreactividad a GABA en el neuropilo marginal (punta de flecha). El asterisco indica el axón de Mauthner. **C-C'':** Astrocitos y neuronas (flechas) GABAérgicas **D-D'':** Astrocitos que expresan inmunorreactividad a glicina. Todas las microfotografías son de larvas procesadas inmediatamente después de la lesión excepto D-D'' que pertenece a un ejemplar procesado 1 día después de la lesión. En todas las figuras dorsal está arriba y lateral a la derecha, excepto en D-D'', en la que lateral está a la izquierda. Barras de calibrado: 20 μm (A-C''); 10 μm (D-D'').



FIGURA 7

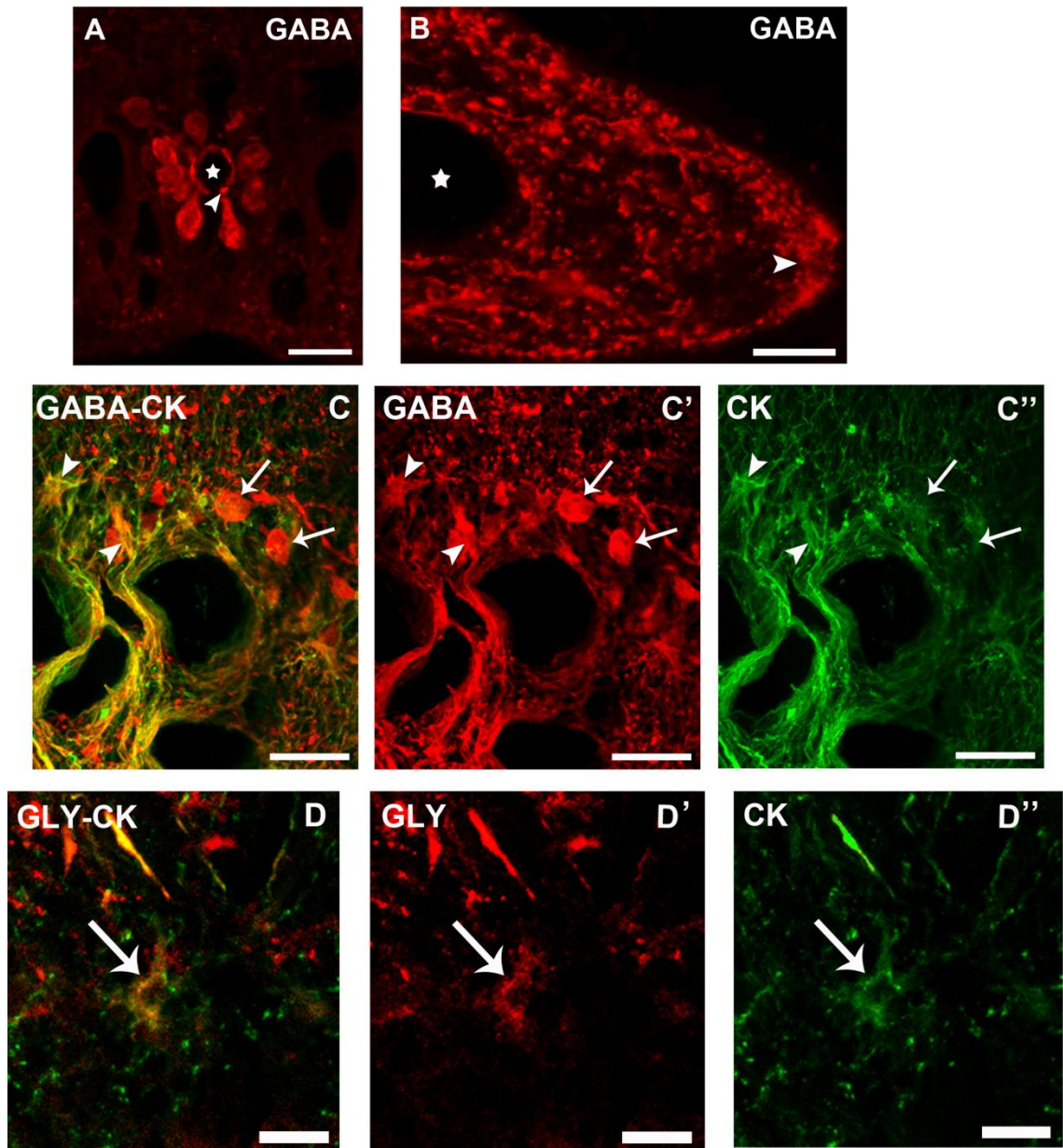


Figura 8.- Microfotografías de secciones transversales de la médula espinal mostrando detalles de inmunoreactividad a glicina (GLY) y a GABA en larvas procesadas de 1 a 3 días después de la lesión. **A, B:** Halos inmunorreactivos a glicina (puntas de flecha) rodeando axones de los funículos dorsal (A) y lateral (B). **C:** Halo inmunorreactivo a GABA rodeando un axón del funículo dorsal. Barras de calibrado: 20 μ m.



FIGURA 8

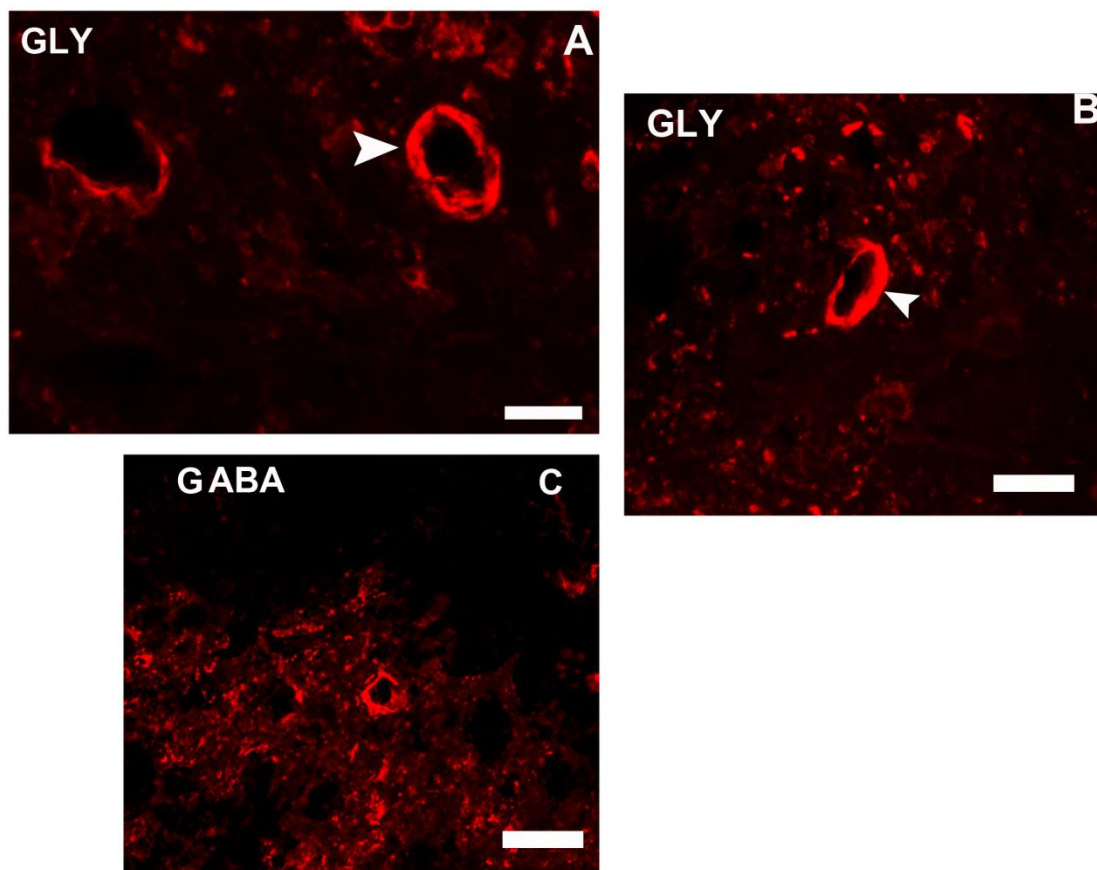
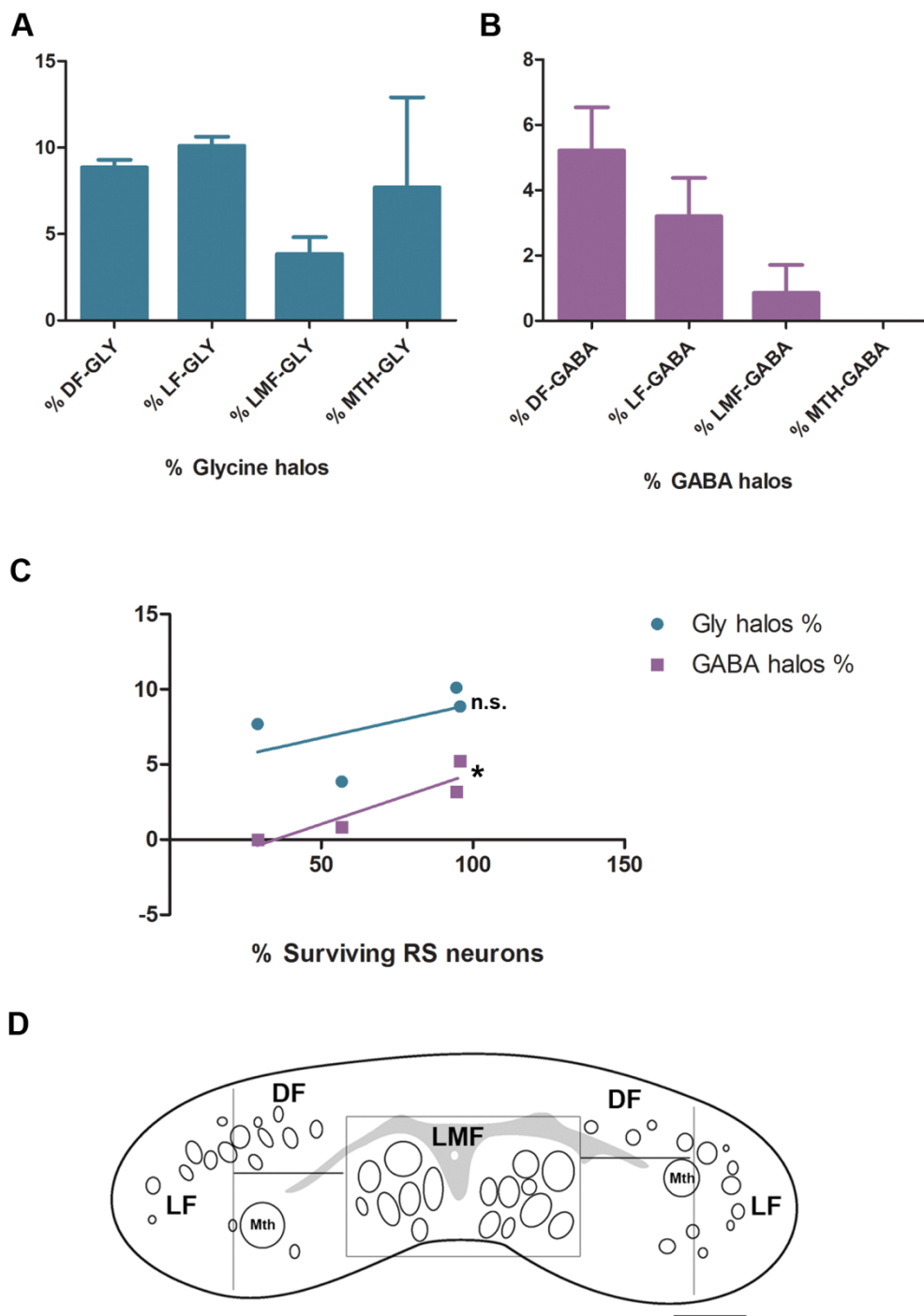


Figura 9. Porcentajes de los “halos” de neurotransmisores inhibidores alrededor de los fascículos dorsal (DF), lateral (LF), longitudinal medial (LMF) y los axones de Mauthner (MTH) de la médula espinal. **A:** Porcentaje de “halos” inmunorreactivos a glicina. **B:** Porcentaje de “halos” inmunorreactivos a GABA. **C:** Para cada uno de los fascículos, los porcentajes de “halos” inmunorreactivos a glicina (círculos azules) y a GABA (cuadrados morados) los “halos” se representaron frente a los porcentajes de supervivencia de las neuronas reticuloespinales (RS) cuyos axones cursan en esos fascículos, previamente descritos por Shifman y col., (2008). La línea representa la recta de regresión más ajustada ($r^2 = 0.29$ en los “halos” de inmunorreactivos a glicina; $r^2 = 0.85$ en los “halos” inmunorreactivos a GABA. El asterisco indica que existe una correlación significativa ($P < 0.05$). **D:** Esquema de la médula espinal que muestra los diferentes fascículos y los axones de Mauthner. Barra de calibrado = $75\mu\text{m}$.



FIGURA 9





Cambios en los sistemas de neurotransmisores inhibidores en la médula espinal de la lamprea de mar durante la regeneración

Inmunorreactividad de Glicina y GABA en la médula espinal

En este estudio, se describen los cambios en la inmunorreactividad de glicina y GABA durante la regeneración de la médula espinal de la lamprea de mar tras la sección completa de la médula espinal.

Como vimos en el apartado anterior, en las larvas de lamprea de mar, la mayoría de los cuerpos celulares glicinérgicos se distribuyen a lo largo de los márgenes dorsomedial y lateral de la sustancia gris, aunque también pueden observarse células glicinérgicas débilmente teñidas en la pared del canal central (Fig. 4 A, C-E). Además, hay escasas células en la sustancia blanca medular: algunas células del borde, unas pocas células intersticiales localizadas en la sustancia blanca ventromedial cerca de los axones reticuloespinales gigantes y, ocasionalmente, pueden encontrarse células que muestran inmunorreactividad a glicina en la columna dorsal.

Las células GABAérgicas en la médula de las larvas de lamprea de mar se localizan en la mayoría de regiones que también contienen células glicinérgicas: en las regiones dorsomedial y lateral de la sustancia gris y alrededor de las paredes del canal central, donde son más abundantes y están teñidas más intensamente que las células glicinérgicas (Fig. 4B, F, G). También se pueden observar ocasionalmente células inmunorreactivas a GABA en la sustancia blanca.

En la médula espinal, la mayoría de las fibras glicinérgicas discurren en las columnas dorsolateral y ventral de la sustancia blanca, mientras que la columna dorsal contiene escasas fibras glicinérgicas (Fig. 4A, 10A). Del mismo modo, las fibras GABAérgicas en la médula espinal son bastante numerosas en la sustancia blanca, excepto en la columna dorsal. La mayor densidad de fibras GABAérgicas se observa en la región adyacente a la columna dorsal (Fig. 4B, 10B). La distribución de las células y fibras inhibitoras aquí descrita concuerda con los resultados de Villar-Cerviño y col., (2008).

Cambios cuantitativos en las células glicinérgicas y GABAérgicas durante la regeneración de la médula espinal

Como se ha explicado en la sección material y métodos, y debido al bajo número de neuronas inhibitoras en la sustancia blanca, se cuantificaron tres poblaciones de células glicinérgicas y GABAérgicas localizadas en la sustancia gris: dorsomedial (DM), lateral (LAT) y células que contactan con el líquido cerebroespinal (CSF-c). Se han analizado los cambios en el número de células glicinérgicas y GABAérgicas rostral y caudalmente al lugar

de la lesión en larvas control (no lesionadas) y en larvas lesionadas a diferentes tiempos de regeneración: 0 dpl, 2, 4, 10 y 24 spl. La distribución de las diferentes poblaciones celulares es muy similar a la que se observa en los animales no lesionados.

En las Figuras 11 y 12 se muestran los cambios en la inmunorreactividad a glicina y en el número de células glicinérgicas de las poblaciones de la sustancia gris, respectivamente, en la médula espinal de ejemplares control y de ejemplares procesados a diferentes tiempos tras la lesión. En la región rostral al lugar de la lesión, a 0 dpl se observa una reducción significativa del 86.2% en el número de neuronas glicina-inmunorreactivas (-ir) de la población dorsal, con respecto a los animales control. A las 2 y 4 spl, existe un aumento significativo del 50.3 y 57.3%, respectivamente, en el número de neuronas glicina-ir de esta población con respecto a las larvas no lesionadas, recuperándose valores similares a los controles a las 10 y 24 spl. La disminución en el número de neuronas glicinérgicas que se observa entre 2 y 4 spl y 10 y 24 spl, es también significativa (Fig. 11 A-D, 12 A). Caudalmente al lugar de la lesión, a 0 dpl se observa una disminución significativa en el número de células glicinérgicas de la población dorsal del 91.9%. A partir de las 2 spl, el número de células recupera niveles similares a los animales control y se mantienen así durante el proceso regenerativo (Fig. 11 A, E-G, 12 B).

En la población de neuronas glicinérgicas laterales, se observa una reducción significativa del número de células a 0 dpl, tanto rostral como caudalmente a la lesión, del 83.4 % y 90.6%, respectivamente, con respecto a las larvas control. Los niveles se recuperan a partir de 2 spl y se mantienen así en todos los tiempos estudiados tras la lesión (Fig. 11, 12 C, D).

La misma tendencia se observa en la población de células glicinérgicas CSF_c. La reducción en el número de neuronas glicinérgicas a 0 dpl es del 86% a nivel rostral y del 98.2% a nivel caudal, con respecto a los animales no lesionados. En ambos casos se recupera el número de células a las 2 spl y continúa sin haber diferencias significativas durante el resto del proceso de regeneración, con respecto a los animales control (Fig. 11, 12 E, F).

En las Figuras 13 y 14 se muestran los cambios en la inmunorreactividad a GABA y en el número de células GABAérgicas de las poblaciones de la sustancia gris, respectivamente, en la médula espinal de ejemplares control y de ejemplares procesados a diferentes tiempos tras la lesión. En relación con los cambios en el número de células de las poblaciones celulares GABAérgicas, todas ellas, tanto rostral como caudalmente al lugar de la lesión, siguen el mismo patrón de recuperación. En todos los casos se observa una disminución significativa en el número de células GABAérgicas a 0 dpl, con respecto a los animales control, seguida de una recuperación a las 2 spl de los niveles encontrados en animales no lesionados, que se mantiene a las 10 y 24 spl. Así, en la población de neuronas GABAérgicas dorsales, la reducción a 0 dpl es del 87.3% a nivel rostral y de 82.1% a nivel caudal (Fig. 13, 14A, B).

En la población lateral, se observa una disminución significativa a 0 dpl del 78.8% y 76.5%, rostral y caudalmente al lugar de la lesión, respectivamente (Fig. 13, 14C, D).

La población de neuronas GABAérgicas CSFc sufre una reducción de su número a 0 dpl del 76.8% a nivel rostral y del 73.2% a nivel caudal (Fig. 13, 14E, F).

Cambios cuantitativos en las fibras glicinérgicas y GABAérgicas durante la regeneración de la médula espinal

La variación en el número de fibras (perfiles) glicinérgicos y GABAérgicos se ha estudiado rostral y caudalmente a la lesión en los individuos control (no lesionados) y en larvas lesionadas a diferentes tiempos de recuperación: 0 dpl, 2, 4, 10 y 24 spl (Fig.15, 17). Para ello, la sustancia blanca de la médula espinal se ha dividido en tres regiones: DM, VM y LAT (Fig.10).

En relación al número de perfiles glicinérgicos, en las tres áreas estudiadas, tanto rostral como caudalmente a la lesión, se observa una reducción significativa en el número de perfiles glicinérgicos a 0 dpl, con respecto a los animales control. A las 2 spl, el número de perfiles glicinérgicos vuelve a valores similares a los observados en las larvas control, no encontrándose diferencias significativas entre las larvas no lesionadas y los animales procesados a 2, 4, 10 y 24 spl.

En la región DM, la disminución en el número de perfiles glicinérgicos a 0 dpl es del 37.8% a nivel rostral y del 41.5% a nivel caudal (Fig. 16 A, B). En la región VM, esta reducción en las áreas rostral y caudal es de un 45% y 46.9%, respectivamente (Fig. 16 E, F). Finalmente, en la región LAT, se observa una disminución en el número de perfiles glicinérgicos a 0 dpl del 48.1% y del 58.6%, rostral y caudalmente al lugar de la lesión, respectivamente (Fig. 16 C, D).

El mismo patrón se observa en cuanto a los cambios en el número de perfiles GABAérgicos. Así, en la región DM, se produce una disminución significativa en el número de perfiles GABAérgicos del 92.9% a nivel rostral y del 95.1% a nivel caudal, a 0 dpl, con respecto a los animales control (Fig. 18 A, B). En la región VM, se observa una reducción significativa del 89.7% y del 92% a nivel rostral y caudal, respectivamente, del número de perfiles GABAérgicos a 0 dpl, con respecto a las larvas no lesionadas (Fig. 18 E, F). Finalmente, en la región LAT, se ha visto una disminución significativa en el número de perfiles GABAérgicos a 0 dpl del 86.1% y del 88%, rostral y caudalmente al lugar de la lesión, respectivamente (Fig. 18 C, D). En todas las regiones y tanto rostral como caudalmente al lugar de la lesión, el número de perfiles GABAérgicos recupera niveles similares a los animales no lesionados a 2 spl y se mantienen así a lo largo de todo el proceso regenerativo (Fig. 18).

Células doblemente marcadas con glicina o GABA y trazador en la zona adyacente a la lesión una y dos semanas después de la misma.

Para conocer el tipo y la proporción de neuronas espinales de proyección ascendente o descendente, se ha aplicado el trazador neurobiotina a ambos lados de los bordes generados en la médula espinal tras una sección medular completa. Las larvas se han procesado dos semanas después de la lesión, combinando la detección del trazador con la detección inmunohistoquímica de los neurotransmisores GABA y glicina. En la región comprendida entre las primeras 150-400 μm desde el lugar de la lesión, se han analizado las células doblemente marcadas con trazador y glicina o GABA (Figs. 19, 20). En estas larvas, el 1,5% de las células glicinérgicas laterales de la zona rostral a la lesión y el 3% de las mismas en la zona caudal presentan doble marcaje. El análisis de las células doblemente marcadas con GABA y neurobiotina muestra que, en la región rostral, el 0,35% de las células dorsales y el 1,5% de las células laterales son dobles mientras que en la región caudal, muestran doble marcaje el 1% de las células CSFc y el 3% de las células laterales.



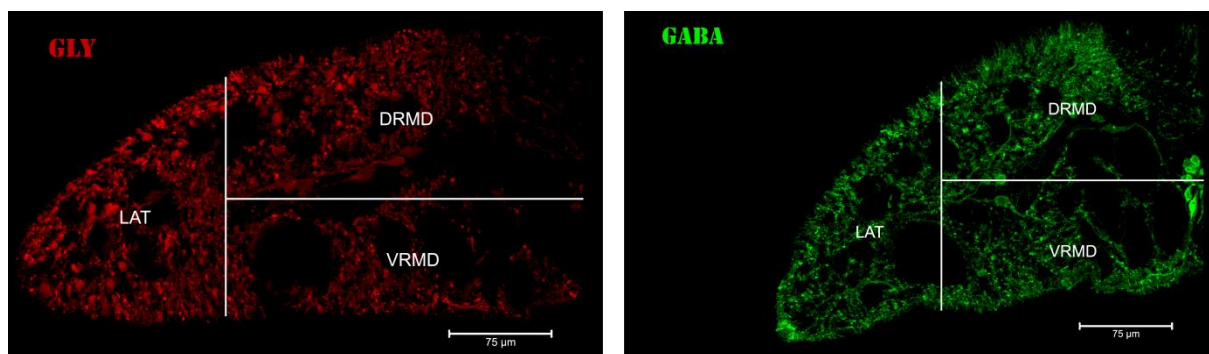


FIGURAS

Figura 10.- Inmunorreactividad a glicina (A) y a GABA (B) en la médula espinal a nivel de la 5° branquia en una lamprea de mar control no lesionada. Microfotografías confocales de una sección transversal de la médula espinal mostrando las 3 regiones en las cuales se dividió la sustancia blanca para cuantificar el número de fibras inmunorreactivas a glicina y a GABA. Dorsomedial (DRMD), ventromedial (VRMD) y lateral (LAT). Barras de calibrado = 75µm.



FIGURA 10



UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

Figura 11.- Microfotografías de secciones transversales mostrando inmunoreactividad a glicina. **A:** células glicinérgicas en una larva control. **B-D:** células glicinérgicas de la región rostral a la lesión en larvas procesadas a distintos tiempos después de la lesión: 0 dpl (B). 2 spl (C). 10 spl (D). **E-G:** células glicinérgicas de la región caudal a la lesión en larvas procesadas a distintos tiempos después de la lesión: 0 dpl (E). 2 spl (F). 10 spl (G). La estrella señala el canal central. Barra de calibrado = 75 μ m



FIGURA 11

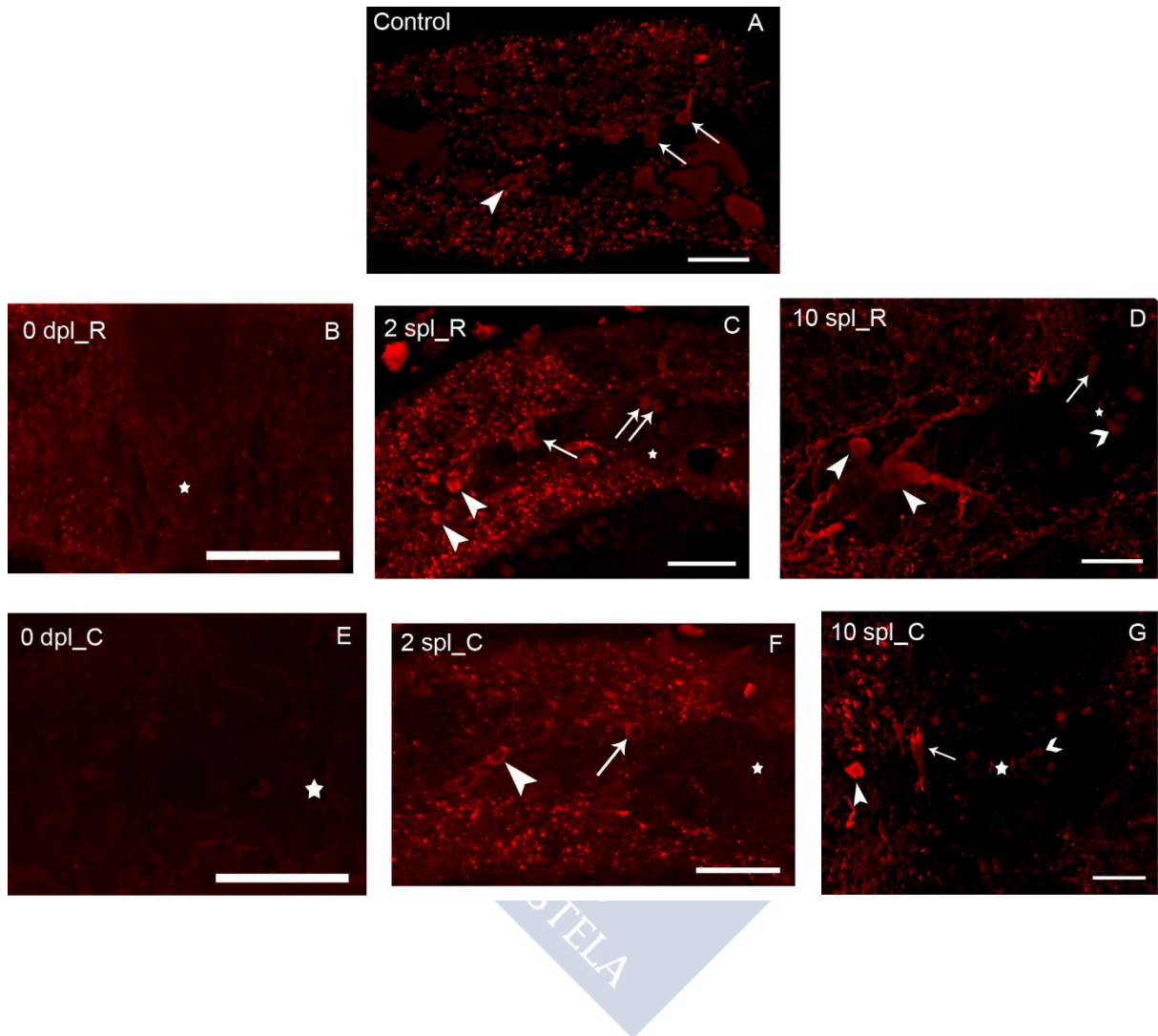


Figura 12.- Gráficos mostrando el número de células inmunorreactivas a glicina por sección en las regiones rostrales y caudales adyacentes al lugar de la lesión. **A, B:** Número de células dorsales inmunorreactivas a glicina en las regiones rostral (A) y caudal (B). **C, D:** Número de células laterales inmunorreactivas a glicina en las regiones rostral (C) y caudal (D). **E, F:** Número de células CSFc inmunorreactivas a glicina en las regiones rostral (E) y caudal (F). $p < 0.0001$. *: 0.01 - 0.05; **: 0.01 - 0.001; ***: 0.001 - 0.0001; **** < 0.0001.



FIGURA 12

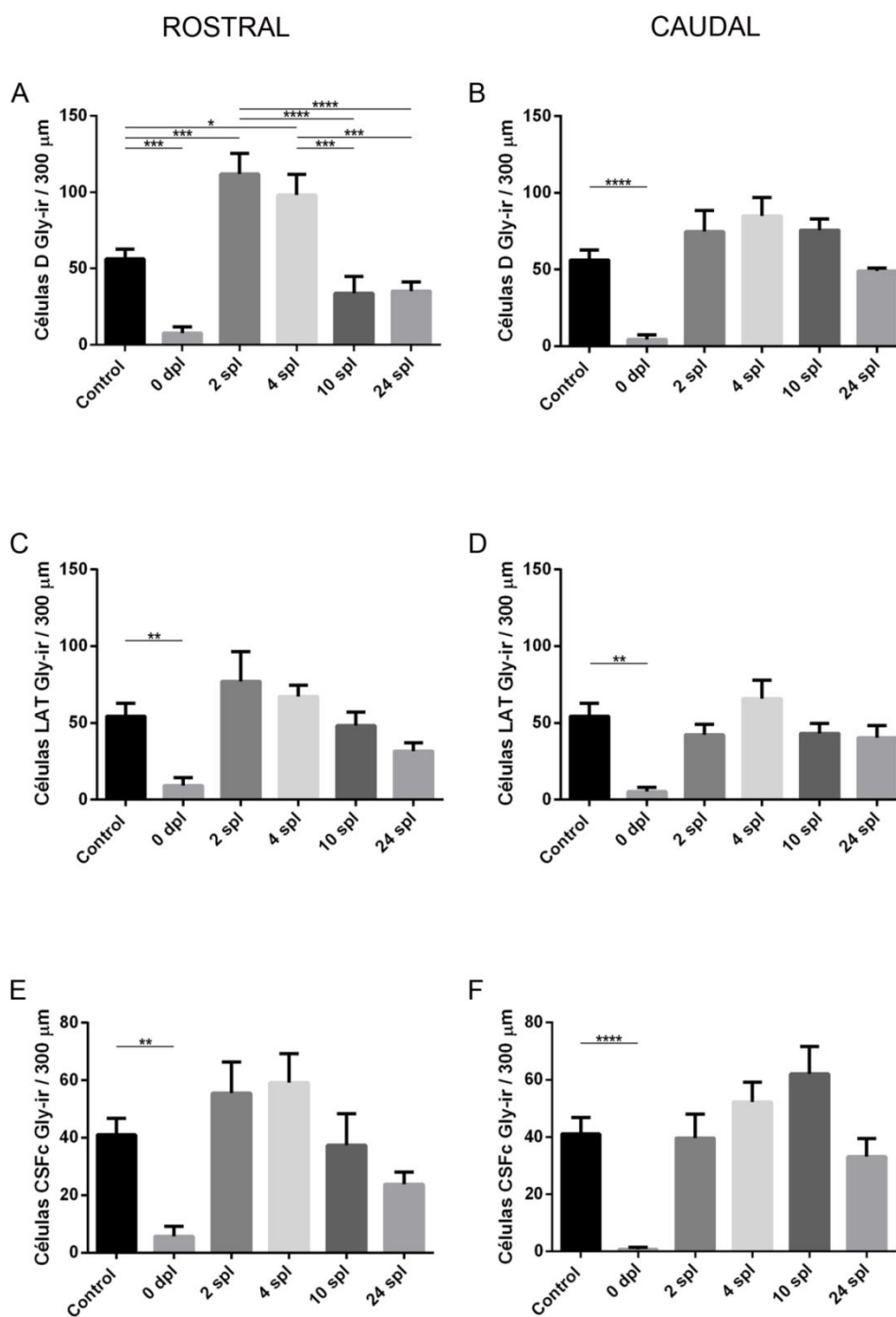
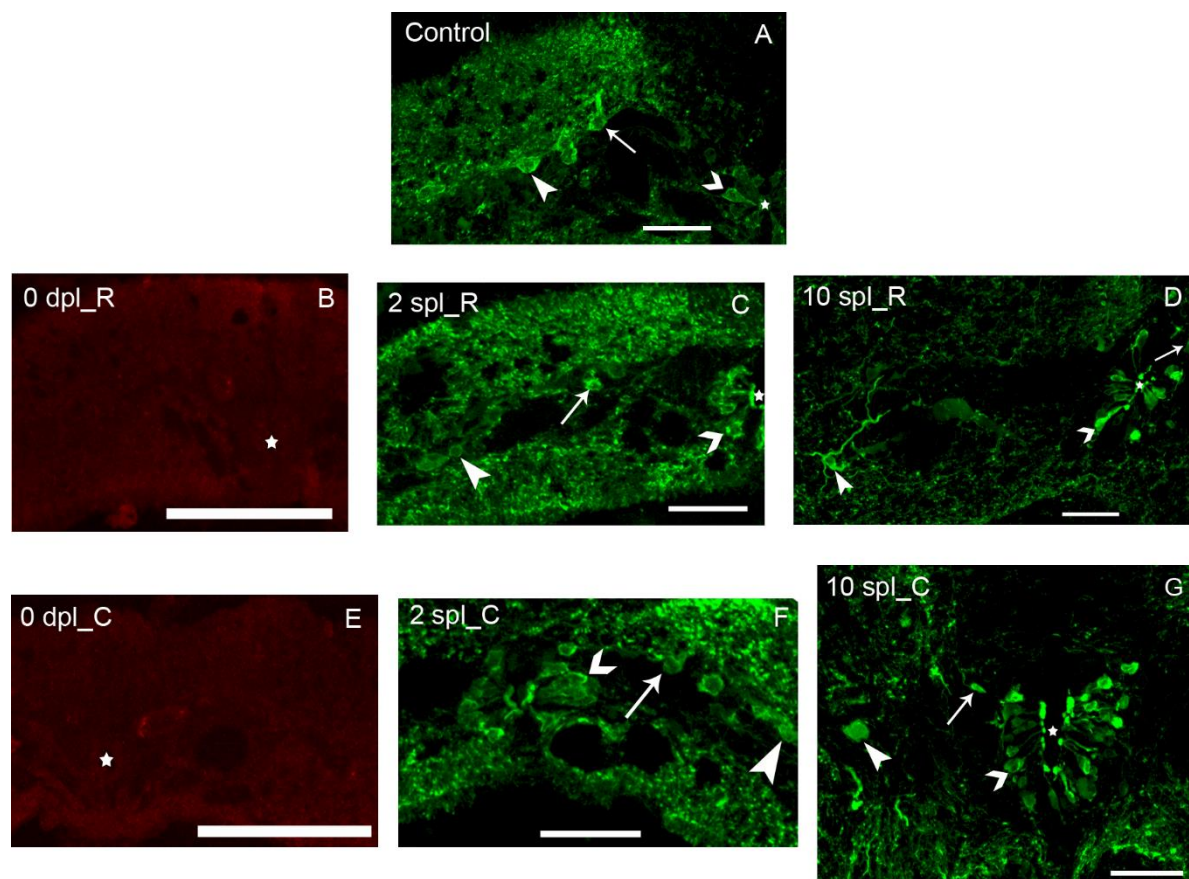


Figura 13.- Microfotografías de secciones transversales mostrando la inmunoreactividad a GABA. **A:** células GABAérgicas en una larva control. **B-D:** células GABAérgicas de la región rostral a la lesión en larvas procesadas a distintos tiempos después de la lesión: 0 dpl (B); 2 spl (C); 10 spl (D). **E-G:** células GABAérgicas de la región caudal a la lesión en larvas procesadas a distintos tiempos después de la lesión: 0 dpl (E); 2 spl (F); 10 spl (G). La estrella señala el canal central. Barra de calibrado = 75µm.



FIGURA 13



UNIVERSIDADE
SANTIAGO
COMPOSTELA

Figura 14.- Gráficos mostrando el número de células inmunorreactivas a GABA por sección en las regiones rostrales y caudales adyacentes al lugar de la lesión. **A, B:** Número de células dorsales inmunorreactivas a GABA en las regiones rostral (A) y caudal (B). **C, D:** Número de células laterales inmunorreactivas a GABA en las regiones rostral (C) y caudal (D). **E, F:** Número de células CSFc inmunorreactivas a GABA en las regiones rostral (E) y caudal (F). $p < 0.0001$.*: 0.01 - 0.05; **: 0.01 - 0.001; ***: 0.001 - 0.0001; **** < 0.0001.



FIGURA 14

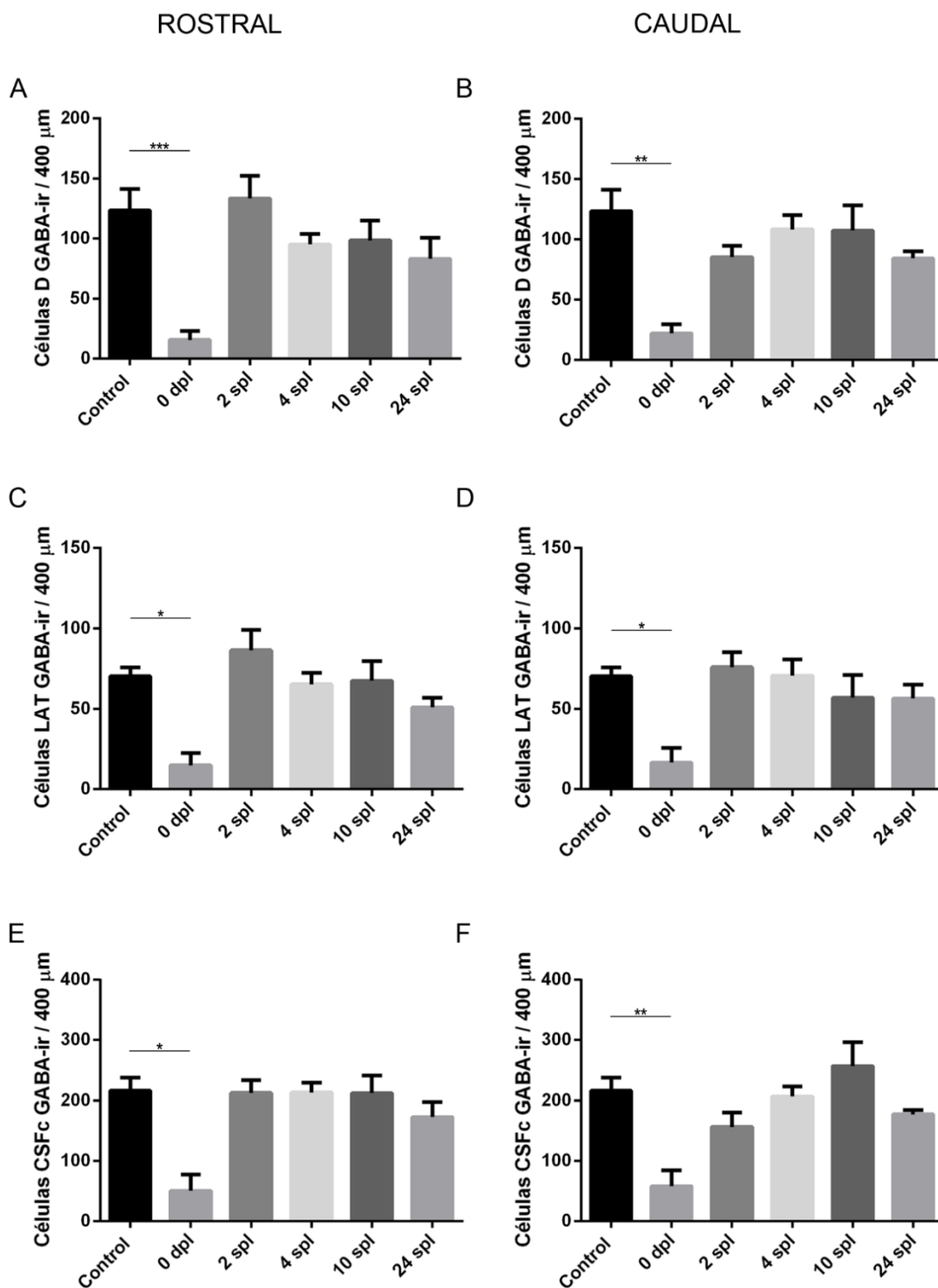


Figura 15.- Microfotografías de secciones transversales mostrando la inmunoreactividad a glicina. **A:** Fibras glicinérgicas en una larva control. **B-F:** fibras glicinérgicas de la región rostral a la lesión en larvas procesadas a distintos tiempos después de la lesión: 0 dpl (B). 2 spl (C). 4 spl (D). 10 spl (E). 24 spl (F). **G-H:** fibras glicinérgicas de la región caudal a la lesión en larvas procesadas a distintos tiempos después de la lesión: 0 dpl (G). 2 spl (H). 4 spl (I). 10 spl (J). 24 spl (K). Barra de calibrado = 75µm.



FIGURA 15

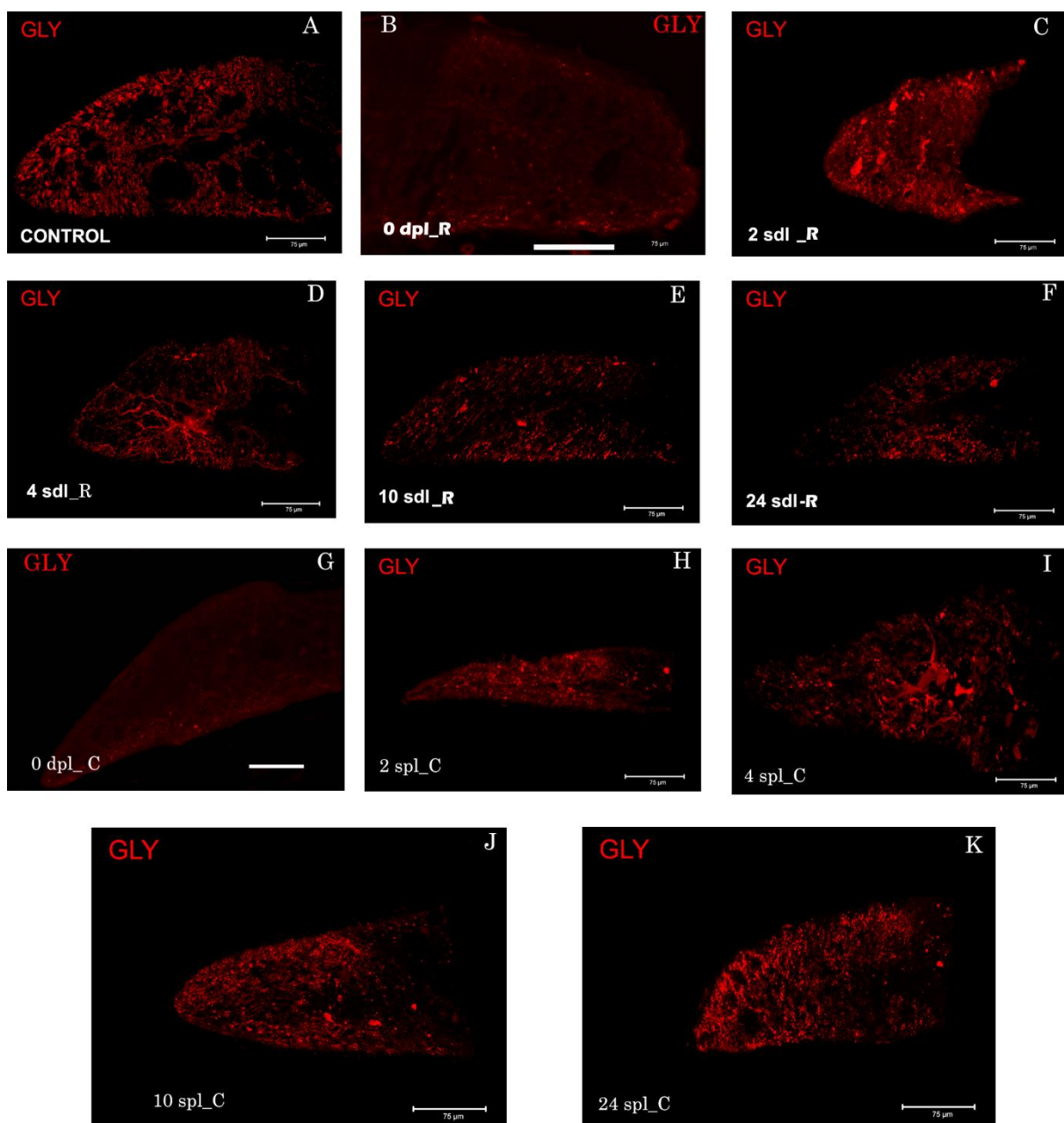


Figura 16.- Gráficos mostrando el número de perfiles inmunorreactivos a glicina por sección en las regiones rostrales y caudales adyacentes al lugar de la lesión. **A, B:** Número de perfiles inmunorreactivos a glicina en las regiones dorsomedial rostral (A) y caudal (B). **C, D:** Número de perfiles inmunorreactivos a glicina en las regiones lateral rostral (C) y caudal (D). **E, F:** Número de perfiles inmunorreactivos a glicina en las regiones ventromedial rostral (E) y caudal (F). $p < 0.0001$. *: 0.01 - 0.05; **: 0.01 - 0.001; ***: 0.001 - 0.0001; **** < 0.0001.



FIGURA 16

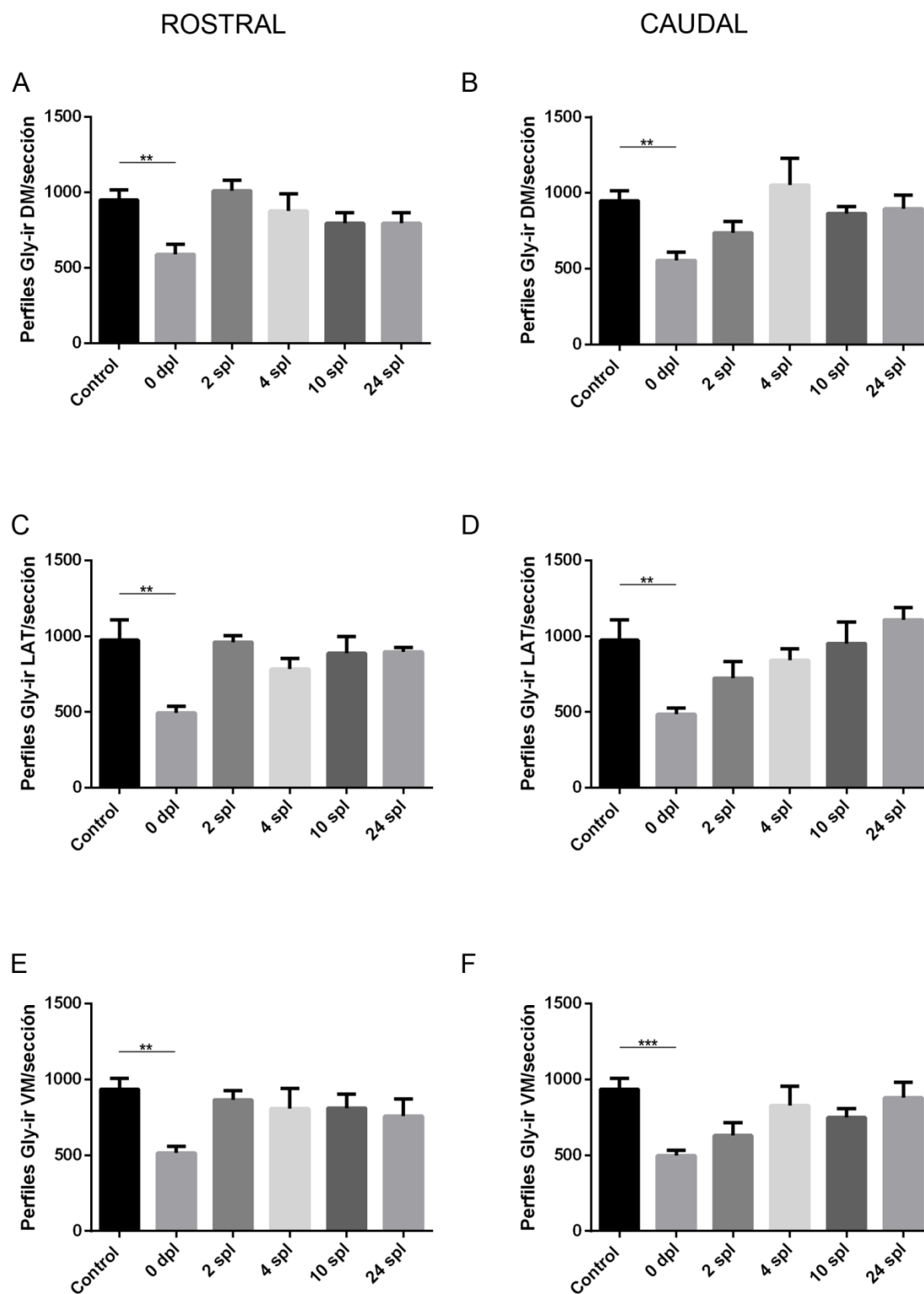


Figura 17.- Microfotografías de secciones transversales mostrando la inmunoreactividad a GABA. **A:** fibras GABAérgicas en una larva control. **B-F:** fibras GABAérgicas de la región rostral a la lesión en larvas procesadas a distintos tiempos después de la lesión: 0 dpl (B). 2 spl (C). 4 spl (D). 10 spl (E). 24 spl (F). **G-H:** fibras GABAérgicas de la región caudal a la lesión en larvas procesadas a distintos tiempos después de la lesión: 0 dpl (G). 2 spl (H). 4 spl (I). 10 spl (J). 24 spl (K). Barra de calibrado = 75µm.



FIGURA 17

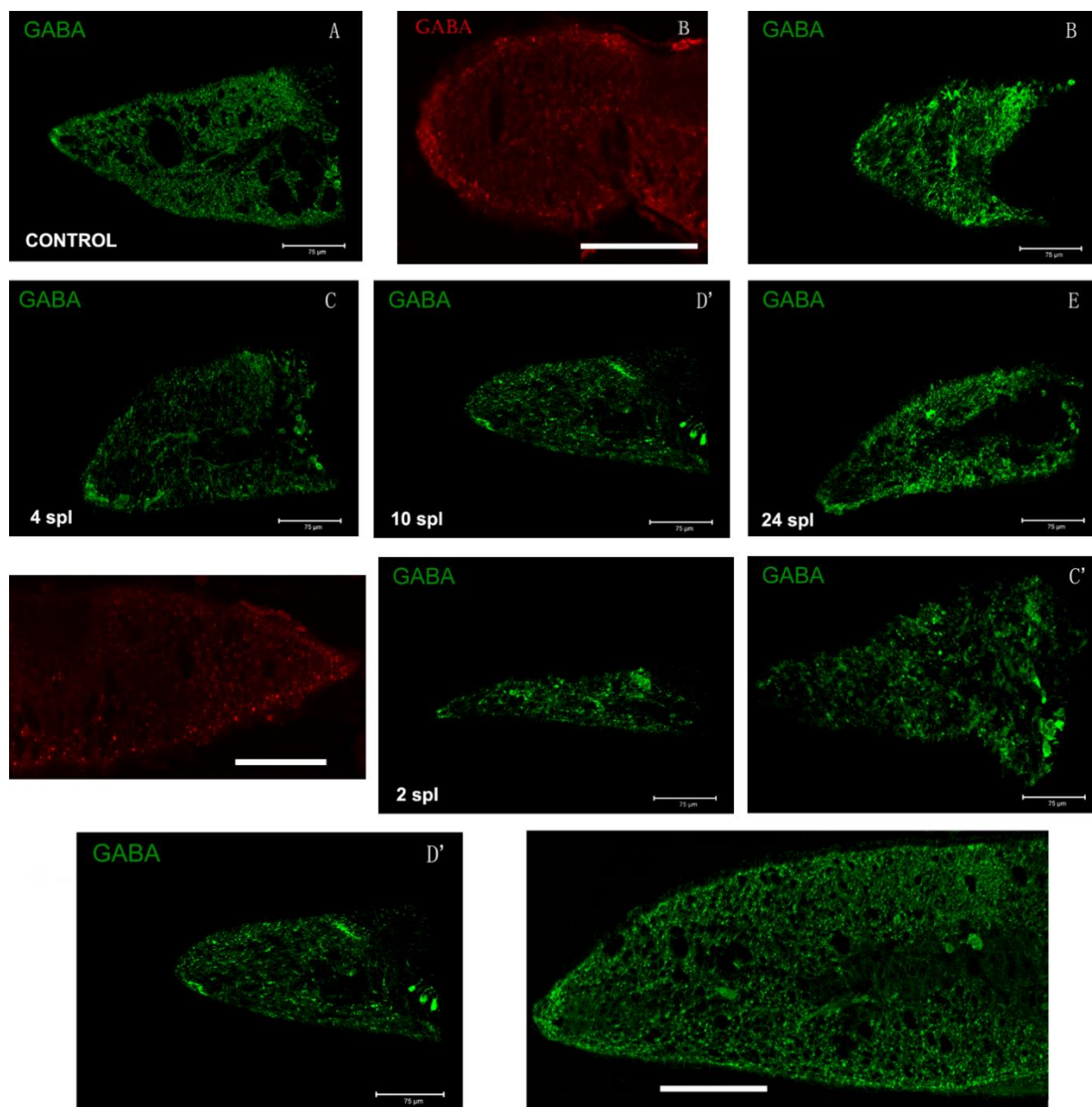


Figura 18.- Gráficos mostrando el número de perfiles inmunorreactivos a GABA por sección en las regiones rostrales y caudales adyacentes al lugar de la lesión. A, B: Número de perfiles inmunorreactivos a GABA en las regiones dorsomedial rostral (A) y caudal (B). C, D: Número de perfiles inmunorreactivos a GABA en las regiones lateral rostral (C) y caudal (D). E, F: Número de perfiles inmunorreactivos a GABA en las regiones ventromedial rostral (E) y caudal (F). $p < 0.0001$. *: 0.01 - 0.05; **: 0.01 - 0.001; ***: 0.001 - 0.0001; **** < 0.0001.



FIGURA 18

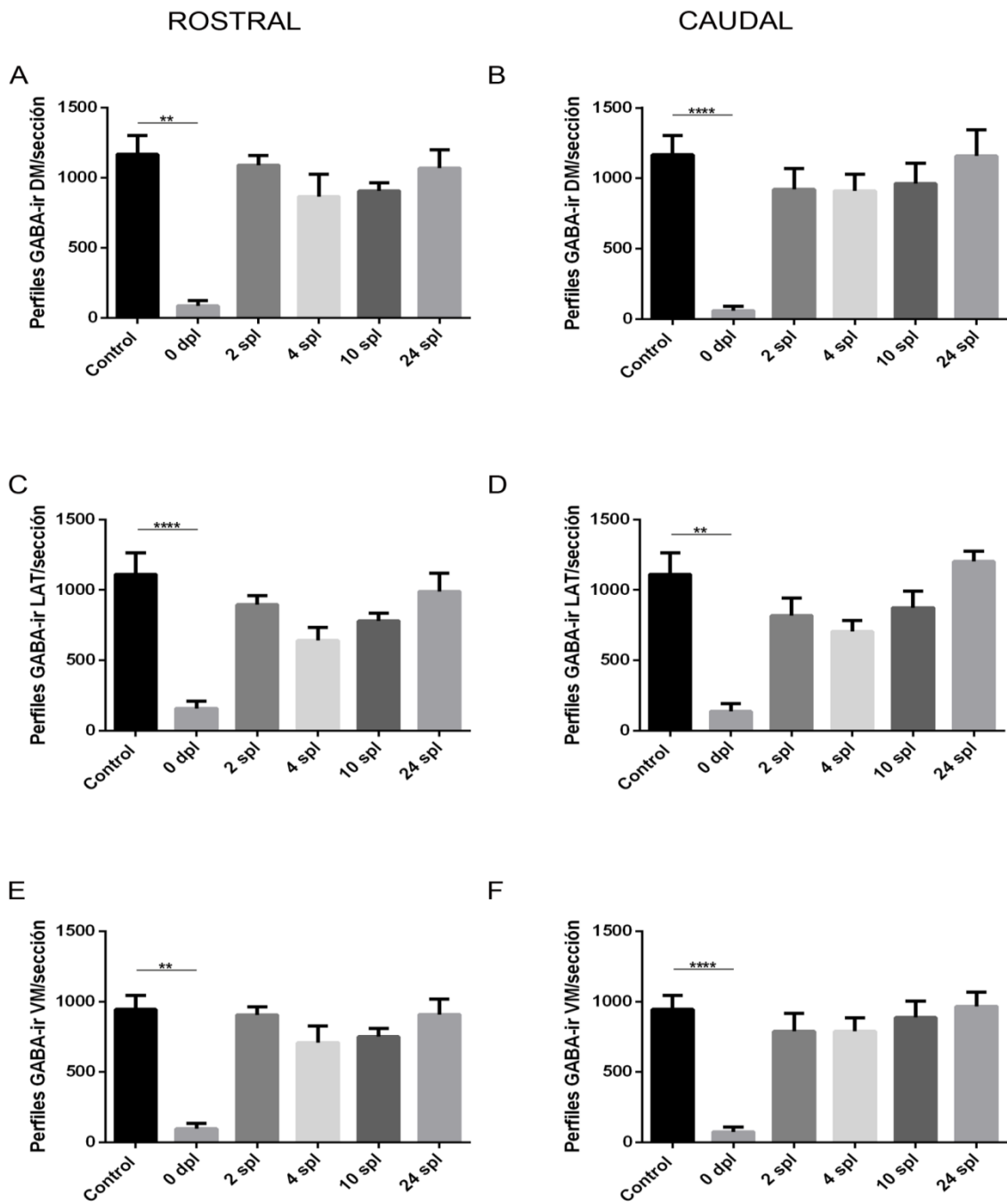
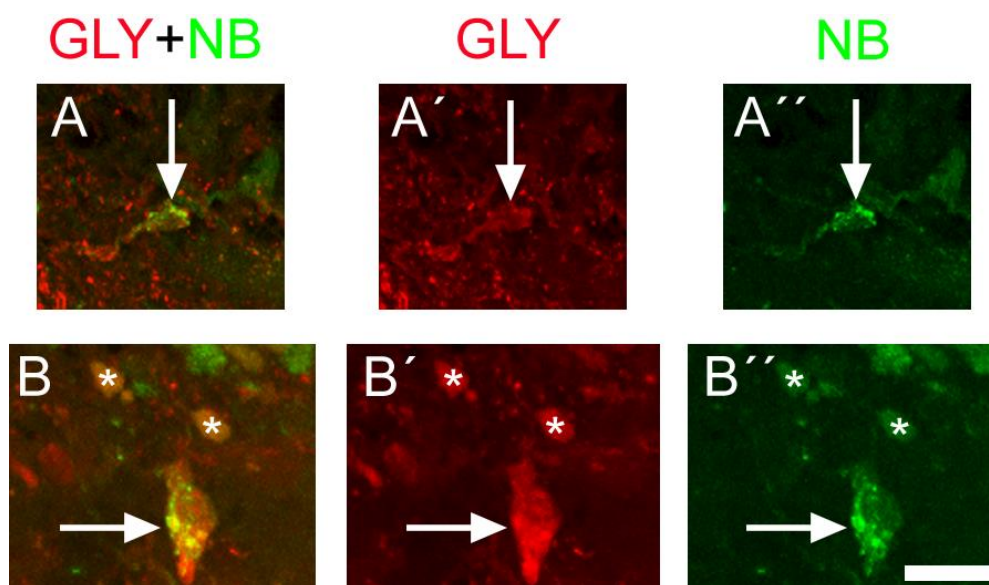


Figura 19.- Recuperación de la inmunorreactividad a glicina en células glicinérgicas axotomizadas. **A-B''**: Microfotografías de secciones transversales de la médula espinal de larvas a 2 spl mostrando células con doble marcaje para glicina y Neurobiotina (NB). **A-A'**: Célula lateral rostral. **B-B''**: Célula lateral caudal. Los asteriscos señalan glóbulos rojos. Barra de calibrado = 20 μ m.



FIGURA 19

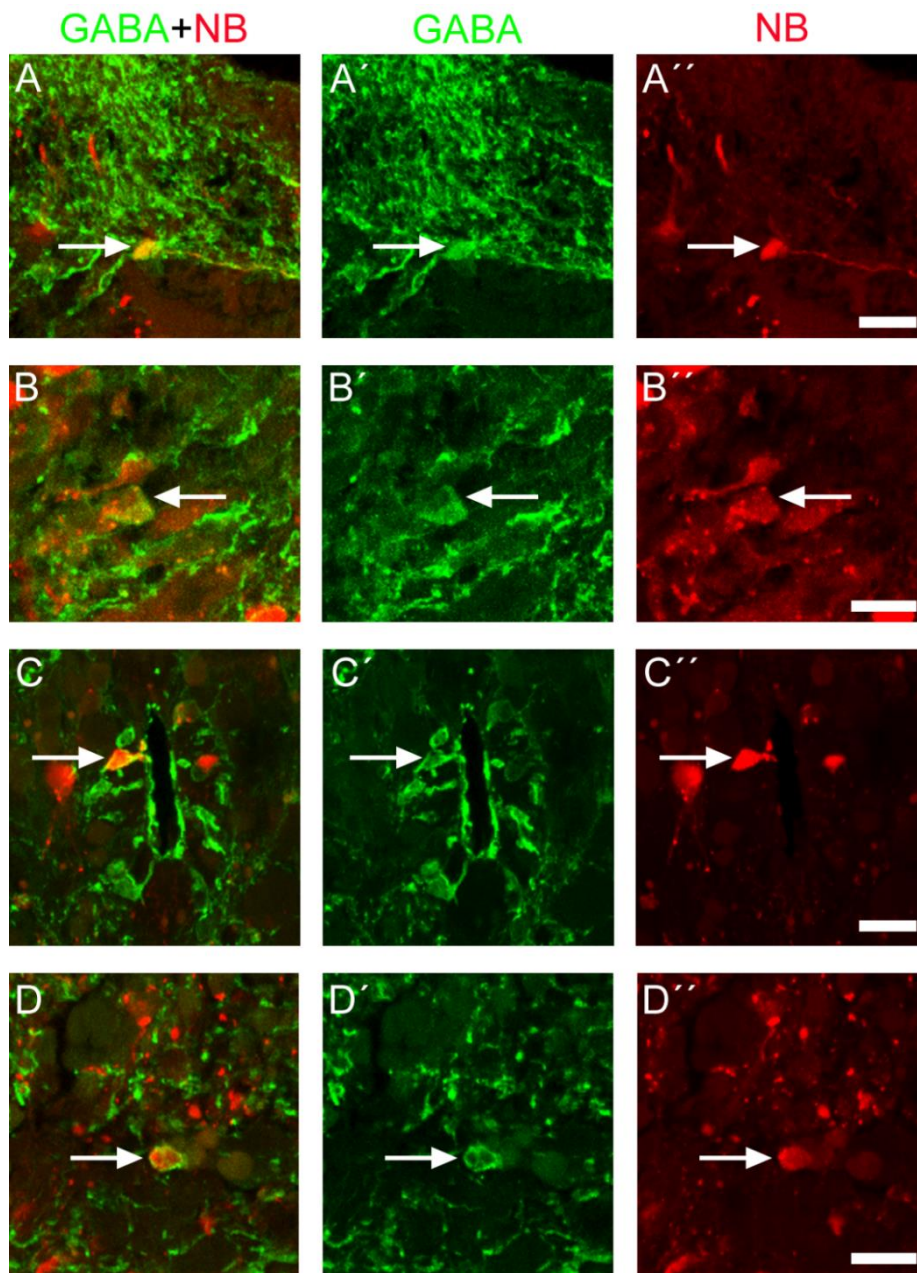


UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

Figura 20.- Recuperación de la inmunorreactividad a GABA en células GABAérgicas axotomizadas. **A-D''**: Microfotografías de secciones transversales de la médula espinal de larvas 2 spl mostrando células con doble marcaje para GABA y Neurobiotina (NB). **A-A''**: Célula dorsal rostral. **B-B''**: Célula lateral rostral. **C-C''**: Células CSFc caudales a la lesión. **D-D''**: Célula lateral caudal. Barra de calibrado= 20 μ m.



FIGURA 20







DISCUSIÓN



DISCUSIÓN

Proyecciones Rombencefálicas Inhibidoras Descendentes en larvas de Lamprea de mar

Células reticuloespinales rombencefálicas inhibitoras

El objetivo de este estudio fue revelar los patrones de expresión de las células reticulares rombencefálicas inhibitoras que proyectan a la médula espinal. A partir de registros de pares de neuronas reticuloespinales y neuronas espinales, Wannier y col. (1995) demostraron que neuronas en el MRRN y el PRRN inhiben sus neuronas diana ejerciendo su acción sobre receptores de glicina. Ellos también demostraron que los IPSPs obtenidos desde una sola neurona reticuloespinal o por estimulación eléctrica de la formación reticular se suprimían con la administración de estriquina, sugiriendo que la glicina es el neurotransmisor utilizado por estas neuronas reticuloespinales (Wannier y col., 1995). Este estudio revela la existencia de tres núcleos glicinérgicos cerebrales localizados en el ARRN, MRRN y PRRN que proyectan a la médula espinal en las larvas de lamprea de mar, confirmando de este modo la existencia de neuronas reticuloespinales inhibitoras glicinérgicas en el MRRN y PRRN y demostrando por primera vez la presencia de neuronas reticuloespinales glicinérgicas en el ARRN. Wannier y col. (1995) indicaron que la velocidad de conducción de los axones inhibitoras reticuloespinales registrada en el MRRN corresponde a la velocidad de conducción de células reticuloespinales grandes e intermedias. Aunque el tamaño de las células reticuloespinales glicina-ir en el MRRN de las larvas estudiadas no es grande, son las células glicina-ir de mayor tamaño en este núcleo y serán considerablemente mayores en adultos, como describió Villar-Cerviño y col. (2008a). Las células reticuloespinales en el PRRN mostraron una velocidad de conducción más baja (Wannier y col., 1995). Mientras que en larvas premetamórficas no existen grandes diferencias de tamaño entre las células glicinérgicas del MRRN y las del PRRN, en adultos estas diferencias son considerables, como demuestran los resultados de Villar-Cerviño y col. (2008a), lo que puede explicar las diferencias en la velocidad de conducción encontradas en el estudio electrofisiológico.

Nuestros resultados muestran que, además de las células glicina-ir, existen células GABA-ir en el ARRN y PRRN con proyección espinal. Estas células no se detectaron previamente en estudios electrofisiológicos, quizás porque en el PRRN, única región que ha sido investigada, las células GABAérgicas son más pequeñas que las células glicinérgicas, lo que dificulta la implantación de electrodos.

El PRRN también contiene células que muestran inmunoreactividad a glicina y a GABA. Se ha descrito con anterioridad un bajo grado de colocalización de glicina y GABA a

nivel reticular rombencefálico (Villar-Cerviño y col., 2008, 2009), pero nuestros resultados no detectaron ninguna neurona de proyección espinal en las que colocalicen glicina y GABA ni en el ARRN ni en el MRRN. Además, la colocalización de estos neurotransmisores en el mismo terminal en la médula espinal de la lamprea de mar también se ha descrito previamente (Shupliakov y col., 1996), siendo alrededor de un tercio dentro de los terminales inhibidores en la médula espinal de la lamprea (Veselkin y col., 2000), pero su origen no ha sido investigado. Tanto neuronas serotoninérgicas (Barreiro-Iglesias y col., 2008a) como GABAérgicas (resultados actuales) del ARRN proyectan a la médula espinal en la lamprea de mar y la colocalización de ambos neurotransmisores también se ha descrito en neuronas de esta región (Barreiro-Iglesias y col., 2009). En ratas la serotonina y el GABA colocalizan en varios núcleos del rafe (Stamp y Semba, 1995), por tanto es posible que también en lamprea haya neuronas de proyección espinal en las que la serotonina colocalice con GABA, pero eso debe ser investigado en estudios futuros.

Comparación con otros vertebrados

Como acabamos de describir la utilización conjunta de técnicas de marcaje neuronal e inmunofluorescencia para glicina y GABA en larvas de lamprea de mar reveló que algunas neuronas inhibitoras en el ARRN, MRRN y PRRN proyectan a la médula espinal. Se han encontrado evidencias electrofisiológicas y anatómicas de células reticuloespinales glicinérgicas y GABAérgicas en especies representativas de algunos grupos de vertebrados. Magoum y Rhines en 1946 fueron los primeros que mostraron que la estimulación eléctrica en la formación reticular bulbar del gato provocaba la inhibición de los reflejos espinales. Estos hallazgos fueron confirmados más tarde en otros estudios (Llinas y Terzuolo, 1964; Jankowska y col., 1968). En la rata mediante la combinación de marcaje neuronal anterógrado y métodos inmunocitoquímicos, se han demostrado proyecciones descendentes GABAérgicas (Holstege, 1991) y glicinérgicas (Holstege y Bongers, 1991) desde la formación reticular ventro-medial y a nivel de una región comprendida entre la oliva inferior rostral y la parte caudal del núcleo facial. Las proyecciones descendentes glicinérgicas desde esta región en la rata (Holstege y Bongers, 1991) pueden ser homólogas a las del MRRN de la lamprea de mar (resultados actuales). En mamíferos, se ha descrito también una amplia inervación GABAérgica de la médula espinal por fibras descendentes desde el rombencéfalo ventromedial rostral (núcleo magnus del rafe) (Reichling y Basbaum, 1990; Antal y col., 1996). Estas proyecciones descendentes GABAérgicas pueden ser homólogas a las del ARRN de la lamprea de mar (resultados actuales). En la rata, en algunas de las fibras terminales de las proyecciones descendentes desde el rombencéfalo ventromedial rostral, el GABA colocaliza con glicina. Estas observaciones contrastan marcadamente con los resultados en lampreas, dado que la colocalización de GABA y glicina en neuronas reticuloespinales se observó solamente en el PRRN.

También se han encontrado neuronas reticuloespinales GABAérgicas en renacuajos de *Xenopus* mediante la utilización de técnicas inmunocitoquímicas para la detección de GABA (Roberts y col., 1987) y se ha propuesto que inhiben neuronas espinales que en condiciones normales intervienen en la natación. Boothby y Roberts (1992) hicieron registros intracelulares desde el rombencéfalo y encontraron neuronas que se excitaban cuando se presionaba la cabeza de los renacuajos. Estas células se han identificado anatómicamente como neuronas reticuloespinales rombencefálicas medias (MHRs) por Perrins y col. (2002).

Estos autores mostraron que estas células poseían una proyección contralateral descendente a la médula espinal e inmunorreactividad a GABA. La comparación de los resultados de la presente investigación en lamprea con los que acabamos de señalar de anfibios y mamíferos indican que las proyecciones reticuloespinales rombencefálicas inhibitorias aparecen temprano en la evolución de los vertebrados. Sin embargo, tanto en mamíferos como en lampreas se han descrito proyecciones reticulares descendentes glicinérgicas y GABAérgicas; mientras, en anfibios solo se ha demostrado hasta el momento inhibición reticuloespinal GABAérgica. Son necesarios estudios en otros grupos de vertebrados para comprender como han evolucionado estos sistemas en los vertebrados.

Significado de la colocalización de dos neurotransmisores inhibitorios “rápidos” en neuronas reticuloespinales

Nuestros resultados muestran la colocalización de glicina y GABA en neuronas del PRRN con proyección espinal. La existencia de la colocalización de inmunorreactividad para glicina y GABA en una neurona sugiere la posible co-liberación de estos neurotransmisores en los terminales sinápticos. La sinapsis glicinérgicas y GABAérgicas poseen similitudes morfológicas. La glicina y el GABA comparten el mismo transportador vesicular presináptico, el transportador vesicular de aminoácidos inhibitorios VIAAT (Dumoulin y col., 1999; Sagné y col., 1997) y pueden activar GlyRs y GABA_ARs postsinápticos (Muller y col., 2008). El primero que describió una liberación conjunta de GABA y glicina en la médula espinal y tronco del encéfalo fue Jonas y col. (1998). La liberación conjunta de GABA y glicina desde una sola vesícula presináptica permite dos niveles de complementariedad funcional. La fuerza del impulso inhibitorio aumenta cuando los dos sistemas inhibitorios están activos. Además, los dos tipos de inhibición son cinéticamente complementarios (Jonas y col. 1998; O'Brien y Berger, 1999). La inhibición mediada por el receptor de glicina es más rápida que la mediada por los receptores GABA_A (O'Brien y Berger, 1999) lo que sugiere que el componente mediado por glicina de la respuesta sináptica dual puede asegurar un bloqueo inmediato del impulso transmitido por la motoneurona mientras que el componente mediado por GABA puede permitir una inhibición más prolongada (Russier y col., 2002). La cotransmisión mediada por glicina y GABA puede proporcionar la regulación precisa en el transcurso de la conductancia postsináptica a través de la cantidad relativa de glicina y GABA liberada desde el terminal presináptico. Esto puede ser de importancia crítica para la coordinación motora (Eccles, 1964) y para la generación de los patrones locomotores (Tegnér y col., 1993). La cotransmisión podría permitir también el retrocontrol de los neurotransmisores liberados por los receptores GABA_B presinápticos, lo que no es posible en la sinapsis glicinérgicas puras. Por último, la cotransmisión puede dar lugar a mecanismos compensatorios cuando exista un defecto genético en una subunidad del receptor de glicina (Brune y col., 1996).

Consideraciones funcionales

La presencia de neuronas glicinérgicas y GABAérgicas en los núcleos rombencefálicos reticulares de lampreas indica que estas neuronas ejercen una acción inhibitoria sobre neuronas espinales. Estas presentaron tres tipos de fenotipos de neurotransmisores inhibitorios diferentes que están distribuidos diferencialmente en todos los

núcleos rombencéfalicos reticulares, lo que sugiere fuertemente que inervan diferentes tipos celulares y/o ejercen diferentes efectos en la médula espinal, como se ha descrito previamente en los núcleos reticuloespinales excitadores de lampreas (Wannier y col., 1998).

Los embriones y renacuajos de *Xenopus* detienen la natación en respuesta a presión sobre la glándula cemental de la cabeza, que está inervada por receptores trigeminales sensibles a presión (Boothby y Roberts, 1992). Las neuronas sensoriales primarias trigeminales excitan neuronas reticuloespinales inhibitorias GABAérgicas localizadas en el rombencéfalo medio (Perrins y col., 2002) que a su vez inhiben motoneuronas e interneuronas premotoras espinales involucradas en la generación del ritmo de la natación y su detención (Li y col., 2003). En nuestros experimentos no se encontraron células GABAérgicas en el MRRN de lampreas, pero si estaban presentes en el PRRN y podrían estar implicadas en la detención de la locomoción. Se ha propuesto también que las células glicinérgicas del MRRN y del PRRN participan en el control supraespinal de la locomoción en la lamprea (Wannier y col., 1995). Además las células GABAérgicas localizadas en el PRRN podrían estar implicadas en el control de la respiración como se ha propuesto en mamíferos para las neuronas GABAérgicas localizadas en la parte caudal del rafe (Cao y col., 2006) ya que en lampreas las células serotoninérgicas no se localizan en la línea media (rafe) sino que están mezcladas con otras células reticulares (revisión en Abalo y col., 2007).

Nuestros resultados también demostraron la presencia tanto de neuronas glicinérgicas como GABAérgicas en el ARRN. En mamíferos, se ha demostrado que las células GABAérgicas del rombencéfalo ventromedial rostral terminan en la médula espinal dorsal y se ha propuesto que forman parte de la inhibición del procesamiento de la información nociceptiva en el asta dorsal de la médula espinal (Reichling y Basbaum, 1990; Antal y col., 1996). Es necesario investigar si las células GABAérgicas reticuloespinales están implicadas en la nocicepción en lampreas.

Cambios en los sistemas de neurotransmisores inhibidores en la médula espinal de la lamprea de mar durante la regeneración.

Este es el primer estudio de la respuesta a corto plazo en la expresión de neurotransmisores aminoacídrgicos inhibidores tras una sección completa de la médula espinal en la lamprea de mar. La expresión de glicina y GABA experimenta alteraciones durante la primera semana tras la lesión. Los cambios se observan en las regiones adyacentes al lugar de la lesión y consisten, principalmente, en la pérdida de inmunorreactividad a los neurotransmisores en las neuronas y en su expresión en los astrocitos. Estos cambios son debidos, probablemente, a la liberación de los neurotransmisores desde las neuronas en respuesta a la lesión y a su recaptación por parte de los astrocitos. Además, se ha observado que un tipo neuronal particular (las células CSFc) pierde la inmunorreactividad a glicina, pero no a GABA tras la lesión.

Liberación de neurotransmisores aminoacídrgicos inhibidores por las neuronas y su recaptación por los astrocitos

En mamíferos, se ha descrito un aumento en los niveles extracelulares de glicina y GABA tras la lesión medular (Panter y col, 1990). Se sabe que la glicina está también involucrada en la neurotransmisión glutamatérgica (revisión en Zafra y Giménez, 2008), ya que es un coagonista obligatorio para la activación de los receptores de glutamato NMDA (Johnson y Ascher, 1987). Por tanto, el incremento de los niveles extracelulares de glicina después de la lesión medular puede potenciar la excitotoxicidad causada por el glutamato (Panter y col., 1990). Nuestros resultados muestran que, en las primeras 24 horas tras la lesión, los astrocitos de la lamprea de mar son inmunorreactivos a glicina. Esto indica que el nivel de glicina en los mismos se ha elevado considerablemente, lo que puede ser debido a la captación de la glicina liberada por las neuronas inmediatamente después de la lesión. Resultados previos de nuestro grupo, han demostrado que los astrocitos de las lampreas son capaces de captar activamente el glutamato que se libera desde las neuronas inmediatamente después de la lesión (Fernández-López, 2014). La presencia de glicina y GABA en los astrocitos tras la lesión sugiere que mecanismos similares están actuando también para captar los neurotransmisores inhibidores inmediatamente después de la lesión. La captación de la glicina por los astrocitos puede prevenir la potenciación de la excitotoxicidad glutamatérgica en lampreas y, junto con la captación del glutamato, es uno de los factores que puede explicar la sorprendente falta de muerte de las neuronas espinales de estos animales en los días posteriores a la lesión medular, demostrada por Shifman y col. (2012).

Contrastando con los efectos tóxicos de los altos niveles de glicina extracelular, se ha demostrado que el GABA tiene efectos neuroprotectores (Chen-Xu y col., 2000; Han y col., 2008; O'Connell y col., 2001; Yang y col., 2000). Aunque el GABA también se acumula en los astrocitos en las primeras 24 horas después de la lesión, la recuperación del patrón de inmunorreactividad a GABA se produce antes que la del de glicina, lo que podría ayudar a alcanzar la recuperación funcional. De hecho, un estudio reciente muestra que la elevación

endógena de los niveles de GABA tras una sección medular completa en lampreas puede estar relacionada con una mejor recuperación de la función (Svensson y col., 2013).

Expresión sostenida de GABA en las células CSFc

A diferencia de otros tipos celulares y de lo que sucede con la glicina, las células CSFc GABAérgicas de las lampreas no pierden la inmunorreactividad a GABA tras la lesión medular en la región que rodea al lugar de la lesión. Resulta interesante que las dendritas apicales de estas células cambien su morfología. Las porciones apicales se aplanan y parecen delimitar el perímetro del canal central. Por el contrario, no se han observado cambios en las dendritas apicales de estas células en las anguilas (Dervan y Roberts, 2003). La persistencia de la inmunorreactividad a GABA en estas células plantea la cuestión de si la liberación de GABA por parte de las células CSFc puede influir en la regeneración en las lampreas. El GABA podría actuar como neuroprotector o como promotor de la regeneración, sin que ambas funciones sean excluyentes. Las células CSFc son las primeras células espinales GABAérgicas que aparecen durante el desarrollo (Meléndez-Ferro y col., 2003). El GABA actúa como un factor que modula varios procesos esenciales durante el desarrollo (ver revisión en Owens y Kriegstein, 2002), la mayoría de los cuales, si no todos, son también necesarios para conseguir la regeneración. La persistencia específica de la expresión de GABA en las células CSFc sugiere que, tras la lesión medular en la lamprea de mar, el GABA puede llevar a cabo un papel similar al que ejerce durante el desarrollo para conseguir la regeneración.

La función de las dendritas apicales en las células CSFc fue objeto de numerosas hipótesis. Se había propuesto que son quimiosensibles (Huang y col., 2006), detectando cambios en la composición del líquido cerebrospinal (CSF) y también otras funciones, como mecanorrecepción o secreción (Vigh y col., 2004). Recientemente se ha demostrado que son quimiorreceptores detectando bajadas de pH y se ha sugerido que protegen de la actividad neuronal excesiva (Jalalvand y col., 2016). El aplanamiento y la reestructuración de las dendritas apicales delimitando el perímetro del canal central indican que éstas responden a la lesión. Parece probable que la liberación masiva de glutamato en respuesta a la lesión provoque descensos del pH y que estas neuronas respondan al mismo. También podrían desempeñar nuevos papeles durante la regeneración. Por ejemplo, formando una barrera física entre el interior del canal central y los espacios extracelulares de la médula espinal. También podrían estar relacionados con otros cambios en el canal central. Por ejemplo, la fibra de Reissner del canal central se interrumpe tras la lesión y los nuevos materiales producidos por ella se acumulan en el lugar de la lesión (Barreiro-Iglesias y col., 2009b). La fibra de Reissner contiene, adhiere y transporta a grandes distancias señales que participan en el desarrollo y otras moléculas, como espondinina del órgano subcomisural, dopamina y serotonina (Caprile y col., 2003; Gobron y col., 2000). Por tanto, su acumulación podría estar relacionada con los cambios observados en las dendritas apicales de las células CSFc.

Acumulación de neurotransmisores inhibidores alrededor de los axones reticuloespinales descendentes identificables

Un resultado sorprendente de este estudio es la presencia de halos inmunorreactivos a glicina y GABA alrededor de algunos axones reticuloespinales descendentes, en respuesta a la lesión. El sistema reticuloespinal tiene un papel predominante en el control de la locomoción (Grillner y col., 2008). La gran acumulación de neurotransmisores inhibidores alrededor de los axones reticuloespinales cerca del lugar de la lesión sugiere que podrían tener un papel en el control del destino de las neuronas reticuloespinales. Se sabe que las diferentes células reticuloespinales identificables de la lamprea tienen distintas capacidades de regeneración (Jacobs y col., 1997) y de supervivencia tras una sección completa de la médula espinal (Barreiro-Iglesias y Shifman, 2012; Shifman y col., 2008). En este estudio, se ha determinado la proporción de axones que presentan halos inhibidores alrededor en diferentes tipos de axones descendentes y se han comparado estos datos con los porcentajes de supervivencia de las neuronas descendentes correspondientes tras la lesión. Rovainen (1976) ha descrito la localización de los axones reticuloespinales identificables en la médula espinal de las lampreas. La capacidad de supervivencia de los axones reticuloenpinales decendientes identificables ha sido descrita por Shifman y col., (2008) 12 meses después de la sección completa de la médula espinal a nivel de la 5ª branquia. Las células de Mauthner, cuyas fibras discurren por el fascículo lateral, y las células de Müller, cuyos axones discurren por el fascículo longitudinal medial, tienen una baja tasa de supervivencia (probabilidad de supervivencia/regeneración menor del 60 %). Sin embargo, las células accesorias de Mauthner y otras neuronas reticuloespinales identificables, cuyos axones discurren principalmente en el fascículo dorsal y también en el lateral, tienen una elevada tasa de supervivencia (probabilidad de supervivencia/regeneración de más del 60 %) (Shifman y col., 2008). Se ha observado una correlación positiva y significativa entre la presencia de halos GABA-inmunorreactivos alrededor de los axones reticuloespinales y la capacidad de supervivencia de las correspondientes neuronas reticuloespinales. Esto sugiere enérgicamente un papel protector del GABA sobre estas neuronas en el lugar de la lesión. La acumulación extracelular de GABA alrededor de los axones reticuloespinales puede deberse a un incremento regulado en la producción y liberación de neurotransmisores inhibidores para hiperpolarizar los axones. Mantener los axones descendentes hiperpolarizados podría protegerlos contra la excitotoxicidad, contrarrestando los efectos perjudiciales que conducirían a la muerte neuronal retrógrada (Saransaari y Oja, 1997).

Cambios en los sistemas de neurotransmisores inhibidores en la médula espinal de la lamprea de mar durante la regeneración.

En el estudio de los cambios que tienen lugar en los sistemas espinales gabaérgico y glicinérgico de la lamprea de mar durante la recuperación tras una lesión medular completa se ha visto que, tras una disminución importante inmediatamente después de la lesión, ambos sistemas recuperan rápidamente el número de células y prolongaciones. El sistema dopaminérgico de la lamprea también se recupera completamente tras la lesión, pero lo hace de manera más lenta (a las 4 spl) (Fernández-López y col., 2015), mientras que los sistemas glutamatérgico (Fernández-López y col., 2016) y serotoninérgico (Cohen y col., 2005) presentan una recuperación incompleta a pesar de la recuperación funcional. Esto indica que en lamprea cada sistema neurotransmisor responde de manera diferente por lo que para poner de manifiesto los mecanismos que subyacen e influyen en la recuperación es importante conocer el comportamiento de cada sistema individual.

Evolución de las poblaciones de células inhibitoras

En relación a los cambios en el número de células, ambos sistemas, gabaérgico y glicinérgico, muestran una drástica disminución inmediatamente después de la lesión en todas las poblaciones, tanto rostral como caudalmente a la lesión, en concordancia con lo que se ha visto en el anterior estudio. Ambos sistemas muestran una rápida recuperación en el número de células a las 2 spl. Sin embargo, mientras en el sistema gabaérgico no se observa un incremento en el número de células de ningún tipo a ningún tiempo postlesión con respecto a los controles, en el sistema glicinérgico se observa este fenómeno en la población dorsomedial rostral. Así, esta población multiplica por dos su número a las 2 y 4 spl, siendo significativo tanto el aumento en el número de células con respecto a las larvas control como la disminución desde las 2 a las 10 y 24 spl, donde los niveles vuelven a ser como en los controles. Además, el número de células CSF_c a nivel rostral aumenta 1,4 veces a las 2 y 4 spl con respecto a los ejemplares control y a nivel caudal aumenta 1,3 y 1,5 veces a las 4 y 10 spl, respectivamente, aunque estas diferencias no llegan a ser significativas. El hecho de que la recuperación sea tan rápida junto a la escasa muerte neuronal que se ha observado durante los dos primeros días después de la lesión en la médula espinal de la lamprea (Fernández-López y col., 2016), sugiere que la gran disminución en el número de células inmediatamente tras la lesión se debe principalmente a la descarga del neurotransmisor. La contribución de la muerte neuronal a la reducción inicial en el número de células también es posible y no se puede excluir. La completa recuperación de estos dos sistemas así como el incremento en el número de células de algunas poblaciones celulares glicinérgicas que se observa a diferentes tiempos tras la lesión podría explicarse por la producción de nuevas neuronas glicinérgicas y GABAérgicas tras la lesión y/o un cambio de fenotipo de otras neuronas que hayan sobrevivido.

Con respecto a la producción de nuevas neuronas, en un estudio reciente, se ha demostrado la existencia de neurogénesis en la médula espinal después de una lesión en lampreas (Zhang y col., 2014), aunque no se ha determinado el tipo de neurotransmisor expresado por estas nuevas neuronas. Tampoco lo hemos podido demostrar aquí debido a los diferentes métodos de fijación del tejido que se requieren para poner de manifiesto la

proliferación celular y el GABA y la glicina. Sobreproducción de células en un determinado momento seguida de una reducción para volver a niveles de animales control se ha observado previamente en la generación de motoneuronas y de neuronas serotoninérgicas en el pez cebra tras una lesión medular (Reimer y col., 2008; Kuscha y col., 2012) y parece estar actuando también en el sistema glutamatérgico de la lamprea (Fernández-López y col., 2016).

Cambios de fenotipo neurotransmisor en respuesta a la lesión han sido puestos de manifiesto recientemente en *Caenorhabditis elegans* (Alam y col., 2016). En este invertebrado, el corte del axón de un tipo de neuronas GABAérgicas induce la expresión temporal de la enzima triptófano hidroxilasa, implicada en la síntesis de serotonina. Estas neuronas llegan a expresar serotonina a niveles detectables mediante inmunofluorescencia. Sin embargo, la adquisición del fenotipo serotoninérgico no implica la pérdida del fenotipo GABAérgico ya que mantienen constante la expresión del transportador vesicular de GABA. Hasta la fecha no hay estudios que investiguen si procesos similares en respuesta a la lesión tienen lugar en células de lamprea o de otros vertebrados.

La aplicación del trazador neurobiotina a los extremos de la médula generados por la lesión y su combinación con la detección de glicina o GABA permite poner de manifiesto las neuronas cuyas prolongaciones han sido seccionadas y los resultados obtenidos indican que su proporción es muy baja. Como la recuperación del número de células inmunorreactivas se obtiene a las dos semanas, analizamos estas células en ejemplares que se dejaron recuperar durante dos semanas. El número de neuronas doblemente marcadas es muy bajo, lo que indica que la mayor parte de las neuronas inhibitoras de la médula espinal participan en circuitos locales y, por lo tanto, no han captado el trazador. Un estudio similar sobre las poblaciones dorsal y lateral de células glutamatérgicas arrojó resultados muy diferentes, con proporciones del 43 al 50% de neuronas glutamatérgicas que coexpresaban el trazador (Fernández-López y col., 2016). Además de poner de manifiesto el gran número de células glutamatérgicas con proyecciones ascendentes o descendentes, la elevada proporción de células doblemente marcadas junto con el escaso número de células glutamatérgicas después de la lesión permitió demostrar la recuperación de la expresión de glutamato en células glutamatérgicas que la han perdido en respuesta a la lesión. La baja proporción de células inhibitoras doblemente marcadas con trazador y glicina o GABA 2 semanas después de la lesión, cuando el número de células que expresan estos neurotransmisores es similar al de los ejemplares control, en relación al número de las que mantienen la expresión de los neurotransmisores después de la lesión, impide determinar si estas neuronas han recuperado la expresión o no la habían perdido.

Las células glicinérgicas doblemente marcadas pertenecen a la población lateral. También hay células de la población lateral GABAérgica doblemente marcadas. En ambos casos aparecen tanto en la región rostral como en la caudal a la lesión. Estas células podrían corresponder a las células espinobulbares situadas en la sustancia gris, algunas de las cuales tienen además proyección descendente (Einum y Buchanan, 2006). Se encontraron también algunas células de la población dorsal GABAérgica rostral a la lesión doblemente marcadas, lo que indica que tienen proyección descendente. Células marcadas con axones ascendentes o descendentes también han sido previamente marcadas con peroxidasa pero la mayor parte de ellas no pudieron ser identificadas (Armstrong y col., 2003). En conjunto, estos resultados sugieren que existe una mayor variedad o complejidad en los tipos celulares de la médula espinal de la lamprea, como ya ha sido apuntado previamente por otros autores (Parker 2006, 2010).

Evolución del número de fibras inhibitoras

La cuantificación de las prolongaciones neuronales en ambos sistemas muestra que experimentan un proceso similar al de los somas, drástica reducción en el número de prolongaciones inmediatamente después de la lesión (0 dpl) y rápida recuperación a las 2 spl. Estos cambios tienen lugar tanto en la zona rostral como en la caudal y son similares en las tres regiones (dorsomedial, lateral y ventromedial) en las que se ha dividido la sustancia blanca. La rápida recuperación de las fibras inhibitoras y la falta de diferencias entre las zonas caudal y rostral y entre las distintas regiones parece deberse a la recuperación de las neuronas intrínsecas que participan en circuitos locales. A favor de esta hipótesis podemos aducir los siguientes hechos: a) Como hemos demostrado en los experimentos con neurobiotina, tanto el número de fibras originadas en neuronas rombencefálicas descendentes como el número de neuronas inhibitoras intrínsecas con proyección ascendente o descendente es muy bajo. b) Las fibras intrínsecas se recuperan antes que las fibras reticuloespinales descendentes que durante las dos primeras semanas se retraen, a la cuarta alcanzan el nivel de la lesión y a partir de la quinta son capaces de atravesarla (Yin y Selzer, 1983). Los datos disponibles indican que, mientras que la mayoría de las neuronas espinales que se recuperan pertenecen a categorías no identificadas (Armstrong y col., 2003), sólo el 40% de los axones que han sido seccionados por la lesión, tanto si son de células intraespinales ascendentes o descendentes, como si son de células reticuloespinales, son capaces de crecer a través de la misma (Davis y McClellan, 1994). Hasta la fecha se ha demostrado la regeneración de los grandes axones reticuloespinales originados en células excitadoras (Davis y McClellan 1994) y de los axones serotoninérgicos originados en la población localizada en el núcleo vagal rombencefálico (Cornide-Petronio y col., 2011) de lamprea, pero la regeneración de axones reticuloespinales inhibitorios todavía no ha sido abordada.

El hecho de que no todas las neuronas sean capaces de regenerar sus axones a través de la lesión indica que a pesar de la recuperación en el número de células y prolongaciones inhibitoras, deben existir mecanismos de plasticidad que contribuyan a la recuperación funcional.

Comparación con otros vertebrados

El efecto de la lesión medular sobre las células inhibitoras sólo ha sido investigado en el asta dorsal de la médula espinal de mamíferos, debido a que en ella se localizan las células GABAérgicas cuya disfunción es responsable del desarrollo del dolor neuropático central después de una lesión medular. Por su origen y localización, las células dorsales de la médula de lamprea podrían equipararse a las células del asta dorsal de mamíferos (Meléndez-Ferro y col., 2003; Villar-Cerviño y col., 2008b). Sea cual sea el modelo de lesión medular utilizado siempre se observa una pérdida de la expresión de GABA (Gwak y col., 2008; Meisner y col., 2010; Zhang y col., 1994) que puede estar asociada a muerte celular (Zhang y col., 1994). Aunque tanto en lampreas como en mamíferos la expresión de GABA disminuye, para poder profundizar en la importancia del GABA en la recuperación son necesarios más estudios en otros vertebrados, tanto en aquellos capaces de regenerar como en aquellos que no o son. Dada la importancia de las células glicinérgicas comisurales en la regulación de la alterancia derecha-izquierda durante la natación también es necesario el estudio de su evolución en otros vertebrados, como paso previo al análisis de su papel durante la regeneración.



CONCLUSIONES





CONCLUSIONES

Este estudio nos ha permitido obtener las siguientes conclusiones:

- 1.- La lamprea de mar posee neuronas inhibitoras reticulares rombencefálicas con proyección descendente glicinérgicas y GABAérgicas. Las neuronas glicina-ir con proyección descendente se localizan en los tres núcleos reticulares rombencefálicos: ARRN, MRRN y PRRN y las neuronas GABA-ir con proyección espinal observadas se localizan en el ARRN y el PRRN. Algunas neuronas inhibitoras del PRRN colocalizan GABA y glicina.
- 2.- La presencia de neuronas glicina-ir y GABA-ir reticuloespinales indica que estas neuronas ejercen una acción inhibitora sobre neuronas espinales.
- 3.- La presencia de proyecciones inhibitoras en la médula espinal de la lamprea indica que éstas han aparecido antes de la divergencia entre Agnatos y Gnastostomados.
- 4.- Tras la lesión medular, y durante los primeros días tras la misma, las neuronas liberan GABA y glicina que son recaptados por los astrocitos. Además se acumulan neurotransmisores inhibitoras alrededor de los axones de las células reticuloespinales “buenas supervivientes/regeneradoras”.
5. En respuesta a la lesión la mayoría de las neuronas pierden el fenotipo neurotransmisor, pero la expresión de GABA se mantiene en las células CSFc GABAérgicas y se producen cambios en la morfología de sus dendritas.
- 6.- Los cambios en los sistemas inhibitoras en respuesta a la lesión, parecen contribuir a la impresionante capacidad de regeneración y supervivencia de la médula espinal de las lampreas.
- 7.- El número de neuronas que expresan neurotransmisores inhibitoras de la médula espinal de la lamprea desciende significativamente después de la lesión y se recupera a los niveles control dos semanas después de la lesión, excepto las células glicinérgicas de la población dorsomedial en la zona rostral que lo hacen a las 10 semanas.
- 8.- El número de prolongaciones que expresan neurotransmisores inhibitoras sigue un patrón homogéneo y similar, descenso significativo después de la lesión y recuperación dos semanas después de la misma. La recuperación del número de prolongaciones inhibitoras parece ser debido a la escasa proporción de fibras extrínsecas e intrínsecas de proyección descendente y ascendente.



BIBLIOGRAFÍA





BIBLIOGRAFÍA

- Abalo XM, Villar-Cheda B, Meléndez-Ferro M, Pérez-Costas E, Anadón R, Rodicio MC. 2007. Development of the serotonergic system in the central nervous system of the sea lamprey. *J Chem Neuroanat* 34:29-46.
- Alam T, Maruyama H, Li C, Pastuhov SI, Nix P, Bastiani M, Hisamoto N, Matsumoto K. 2016 Axotomy-induced HIF-serotonin signalling axis promotes axon regeneration in *C. elegans*. *Nat Commun*. 7:10388.
- Antal M, Petkó M, Polgár E, Heizmann CW, Storm-Mathisen J. 1996. Direct evidence of an extensive GABAergic innervation of the spinal dorsal horn by fibres descending from the rostral ventromedial medulla. *Neuroscience* 73:509-518.
- Ariens Kappers CU. 1947. Anatomie compare du système nerveux. Bohn, Haarlem, The Netherlands.
- Armstrong J, Zhang L, McClellan, A. D.2003. Axonal regeneration of descending and ascending spinal projection neurons in spinal cord-transected larval lamprey. *Exp. Neurol*. 180:156–166.
- Baev KV, Rusin KI, Safronov BV. 1992. Primary receptor for inhibitory transmitters in lamprey spinal cord neurons. *Neuroscience* 46:931-941.
- Barker JL, Ransom BR. 1978. Amino acid pharmacology of mammalian central neurones grown in tissue culture. *J Physiol* 280:331–354.
- Barreiro-Iglesias A. 2012.'Evorego': studying regeneration to understand evolution, the case of the serotonergic system. *Brain Behav Evol* 79:1-3
- Barreiro-Iglesias A, Cornide-Petronio ME, Anadón R, Rodicio MC. 2009. Serotonin and GABA are colocalized in restricted groups of neurons in the larval sea lamprey brain: insights into the early evolution of neurotransmitter colocalization in vertebrates. *J Anat* 215:435-443.
- Barreiro-Iglesias A, Shifman MI. 2012. Use of fluorochrome-labeled inhibitors of caspases to detect neuronal apoptosis in the whole-mounted lamprey brain after spinal cord injury. *Enzyme Res* 2012:835731.
- Barreiro-Iglesias A, Villar-Cerviño V, Anadón R, Rodicio MC. 2008a. Development and organization of the descending serotonergic brainstem-spinal projections in the sea lamprey. *J Chem Neuroanat* 36:77-84.

- Barreiro-Iglesias A, Villar-Cerviño V, Anadón R, Rodicio MC. 2008b. Descending brain-spinal cord projections in a primitive vertebrate, the lamprey: cerebrospinal fluid-contacting and dopaminergic neurons. *J Comp Neurol* 511:711-723.
- Batueva V, Suderevskaya EI, Vesselkin NP, Pierre J, Repérant J. 1990. Localisation of GABA-immunopositive cells in the river lamprey spinal cord. *J Hirnforsch* 31:739-745.
- Ben-Ari Y, Gaiarsa JL, Tyzio R, Khazipov R. 2007. GABA: a pioneer transmitter that excites immature neurons and generates primitive oscillations. *Physiol. Rev.* 87, 1215-1284.
- Berki AC, O'Donovan MJ, Antal M. 1995. Developmental expression of glycine immunoreactivity and its colocalization with GABA in the embryonic chick lumbosacral spinal cord. *J Comp Neurol* 362:583-596.
- Betz H. 1987. Biology and structure of the mammalian glycine receptor. *Trends Neurosci* 10:113-117.
- Betz H, Becker CM. 1988. The mammalian glycine receptor: biology and structure of a neuronal chloride channel protein. *Neurochem Int* 13:137-146.
- Boothby KM, Roberts A. 1992. The stopping response of *Xenopus laevis* embryos: pharmacology and intracellular physiology of rhythmic spinal neurones and hindbrain neurones. *J Exp Biol* 169:65-86.
- Bormann J, Feigenspan A. 1995. GABA_C receptors. *Trends Neurosci* Bormann J, Hamill OP, Sakmann B. 1987. Mechanism of anion permeation through channels gated by glycine and gamma-aminobutyric acid in mouse cultured spinal neurones. *J Physiol* 385:243-286.
- Brocard F, Dubuc R. 2003. Differential contribution of reticulospinal cells to the control of locomotion induced by the mesencephalic locomotor region. *J Neurophysiol* 90:1714-1727.
- Brodin L, Dale N, Christenson J, Storm-Mathisen J, Hökfelt T, Grillner S. 1990. Three types of GABA-immunoreactive cells in the lamprey spinal cord. *Brain Res* 508:172-175.
- Brune W, Weber RG, Saul B, von Knebel Doeberitz M, Grond-Ginsbach C, Kellerman K, Meinck HM, Becker CM. 1996. A GLYRA1 null mutation in recessive hyperekplexia challenges the functional role of glycine receptors. *Am J Hum Genet* 58:989-997.
- Buchanan JT. 1996. Lamprey spinal interneurons and their roles in swimming activity. *Brain Behav Evol* 48:287-296.
- Buchanan JT. 1999. The roles of spinal interneurons and motoneurons in the lamprey locomotor network. *Prog Brain Res* 123:311-321.
- Buchanan JT. 2001. Contributions of identifiable neurons and neuron classes to lamprey vertebrate neurobiology. *Prog Neurobiol* 63(4):441-66
- Buchanan JT, Brodin L, Dale N, Grillner S. 1987. Reticulospinal neurones activate excitatory amino acid receptors. *Brain Res* 408:321-325.

- Buchanan JT, Grillner S. 1987. Newly identified 'glutamate interneurons' and their role in locomotion in the lamprey spinal cord. *Science* 236:312-314.
- Buchanan JT, Einum JF. 2008. The spinobulbar system in lamprey. *Brain Res Rev* 57:37-45.
- Bussi eres N, Pflieger JF, Dubuc R. 1999. Anatomical study of vestibulospinal neurons in lampreys. *J Comp Neurol* 407:512-526.
- Cangiano L, Grillner S. 2005. Mechanisms of rhythm generation in a spinal locomotor network deprived of crossed connections: the lamprey hemicord. *J Neurosci* 25:923-935.
- Cao Y, Matsuyama K, Fujito Y, Aoki M. 2006. Involvement of medullary GABAergic and serotonergic raphe neurons in respiratory control: electrophysiological and immunohistochemical studies in rats. *Neurosci Res* 56:322-331.
- Caprile T, Hein S, Rodriguez S, Montecinos H, Rodriguez E. 2003. Reissner fiber binds and transports away monoamines present in the cerebrospinal fluid. *Brain Res Mol Brain Res* 110:177-192.
- Chen G, Trombley PQ, van den Pol AN. 1996. Excitatory actions of GABA in developing rat hypothalamic neurones. *J Physiol* 494:451-464.
- Chen-Xu W, Yi Y, Qiu L, Shuaib A. 2000. Neuroprotective activity of tiagabine in a focal embolic model of cerebral ischemia. *Brain Res* 874:75-77.
- Choi MY. 1988. Dynamic model of neural networks. *Phys Rev Lett* 61:2809-2812
- Christenson J, Bongiani F, Grillner S, H okfelt T. 1991. Putative GABAergic input to axons of spinal interneurons and primary sensory neurons in the lamprey spinal cord as shown by intracellular Lucifer yellow and GABA immunohistochemistry. *Brain Res* 538:313-318.
- Christenson J, Alford S, Grillner S, H okfelt T. 1991. Co-localized GABA and somatostatin use different ionic mechanisms to hyperpolarize target neurons in the lamprey spinal cord. *Neurosci Lett* 134:93-97.
- Cohen AS, Coussens CM, Raymond CR, Abraham WC. 1999. Long-lasting increase in cellular excitability associated with the priming of LTP induction in rat hippocampus. *J Neurophysiol* 82:3139-3148.
- David-Watine B, Goblet C, de Saint Jan D, Fucile S, Devignot V, Bregestovski P, Korn H. 1999. Cloning, expression and electrophysiological characterization of glycine receptor alpha subunit from zebrafish. *Neuroscience* 90:303-317.
- Davis GR Jr, McClellan AD. Extent and time course of restoration of descending brainstem projections in spinal cord-transected lamprey. *J Comp Neurol* 344:65-82.
- Deliagina TG, Fagerstedt P. 2000. Responses of reticulospinal neurons in intact lamprey to vestibular and visual inputs. *J Neurophysiol* 83:864-878.

- Deliagina TG, Grillner S, Orlovsky GN, Ullén F. 1993. Visual inputs affects the response to roll in reticulospinal neurons of the lamprey. *Brain Res* 95:421-428.
- Deliagina TG, Orlovsky GN, Grillner S, Wallén P. 1992. Vestibular control of swimming in lamprey. III. Activity of vestibular afferents: converge of vestibular inputs on reticulospinal neurons. *Brain Res* 90:499-507.
- Deliagina TG, Zelenin PV, Faderstedt P, Grillner S, Orlovsky GN. 2000. Activity of reticulospinal neurons during locomotion in the freely behaving lamprey. *J Neurophysiol* 83:853-863.
- Demediuk P, Daly MP, Faden AI. 1989. Effect of impact trauma on neurotransmitter and nonneurotransmitter amino acids in rat spinal cord. *J Neurochem* 52:1529-1536.
- Dervan AG, Roberts BL. 2003. Reaction of spinal cord central canal cells to cord transection and their contribution to cord regeneration. *J Comp Neurol* 458:293-306.
- Drew KL, Pehek EA, Rasley BT, Ma YL, Green TK. 2004. Sampling glutamate and GABA with microdialysis: suggestions on how to get the dialysis membrane closer to the synapse. *J Neurosci Methods* 140:127-131.
- Dubuc R, Brocard F, Antri M, Fénelon K, Gariépy JF, Smetana R, Ménard A, Le Ray D, Viana Di Prisco G, Pearlstein E, Sirota MG, Derjean D, St-Pierre M, Zielinski B, Auclair F, Veilleux D. 2008. Initiation of locomotion in lampreys. *Brain Res Rev* 57:172-182.
- Dumoulin A, Rostaing P, Bedet C, Lévi S, Isambert MF, Henry JP, Triller A, Gasnier B. 1999. Presence of the vesicular inhibitory amino acid transporter in GABAergic and glycinergic synaptic terminal boutons. *J Cell Sci* 112:811-823.
- Eccles JC. 1964. Presynaptic inhibition in the spinal cord. *Prog Brain Res* 12:65-91
- Einum JF, Buchanan JT. 2006. Spinobulbar neurons in lamprey: cellular properties and synaptic interactions. *J Neurophysiol* 96:2042-2055.
- El Manira A, Pombal MA, Grillner S. 1997. Diencephalic projection to reticulospinal neurons involved in the initiation of locomotion in adult lampreys *Lampetra fluviatilis*. *J Comp Neurol* 29: 603-616.
- Fagerstedt P, Zelenin PV, Deliagina TG, Orlovsky GN, Grillner S. 2000. Crossed reciprocal inhibition evoked by electrical stimulation of the lamprey spinal cord. *Exp Brain Res* 13:147-154.
- Fernández-López B, Barreiro-Iglesias A, Rodicio MC. 2014a. Confocal microscopy used for the semiautomatic quantification of the changes in aminoacidergic fibres during spinal cord regeneration. En *Laser Scanning Microscopy and Quantitative Image Analysis of Neuronal Tissue. Neuromethods* 87:239-250.
- Fernández-López B, Barreiro-Iglesias A, Rodicio MC. 2016. Anatomical recovery of the spinal glutamatergic system following a complete spinal cord injury in lampreys. *Sci Rep* 6:37786.

Fernández-López B, Romaus-Sanjurjo D, Cornide-Petronio ME, Gómez-Fernández S, Barreiro-Iglesias A, Rodicio MC. 2015. Full anatomical recovery of the dopaminergic system after a complete spinal cord injury in lampreys. *Neural Plast* 2015:350750.

Fernández-López B, Valle-Maroto SM, Barreiro-Iglesias A, Rodicio MC. 2014. Neuronal release and successful astrocyte uptake of aminoacidic neurotransmitters after spinal cord injury in lampreys. *Glia* 62:1254-1269.

Filli L, Schwab ME. 2015. Structural and functional reorganization of propriospinal connections promotes functional recovery after spinal cord injury. *Neural Regen Res* 10:509–513.

Fink AJ, Croce KR, Huang ZJ, Abbott LF, Jessell TM, Azim E. 2014. Presynaptic inhibition of spinal sensory feedback ensures smooth movement. *Nature* 509:43-48.

Gaiarsa J-L, Porcher C. 2013 Emerging neurotrophic role of GABAB receptors in neuronal circuit development. *Front Cell Neurosci* 7:206.

Grillner S. 1981. Control of locomotions in bipeds, tetrapods, and fish. In: Handbook of Physiology. The Nervous System II (Brooks VB, ed), pp 1179-1236. Baltimore: American Physiological Society.

Grillner S. 2003 The motor infrastructure: from ion channels to neuronal networks. *Nat Rev Neurosci* 4:573-586.

Grillner S, Deliagina T, Ekeberg O, el Manira A, Hill RH, Lanser A, Orlovsky GN, Wallén P. 1995. Neural networks that co-ordinate locomotion and body orientation in lamprey. *Trends Neurosci* 18: 270-279.

Grillner S, McClellan A, Sigvardt K, Wallén P, Wilén M. 1981. Activation of NMDA-receptors elicits "fictive locomotion" in lamprey spinal cord in vitro. *Acta Physiol Scand*. 113:549-551.

Grillner S, Wallén P, Saitoh K, Kozlov A, Robertson B. 2008. Neural bases of goal-directed locomotion in vertebrates – an overview. *Brain Res Rev* 57: 2-12.

Grillner S, Wallén P. 1985. Central pattern generators for locomotion, with special reference to vertebrates. *Rev Neurosci* 8:233-261.

Grillner S, Wallén P. 1980. Does the central pattern generation for locomotion in lamprey depend on glycine inhibition? *Acta Physiol Scand* 110:103-105.

Grillner S, Wallén P, Saitoh K, Kozlov A, Robertson B 2008. Neural bases of goal-directed locomotion in vertebrates--an overview. *Brain Res Rev* 57:2-12.

Gobron S, Creveaux I, Meiniel R, Didier R, Herbet A, Bamdad M, El Bitar F, Dastugue B, Meiniel A. 2000. Subcommissural organ/Reissner's fiber complex: Characterization of SCO-spondin, a glycoprotein with potent activity on neurite outgrowth. *Glia* 32:177–191.

Gustafsson AB, Sayen MR, Williams SD, Crow MT, Gottlieb RA. 2002. TAT protein transduction into isolated perfused hearts: TAT-apoptosis repressor with caspase recruitment domain is cardioprotective. *Circulation* 106:735-739.

- Guth L, Brewer CR, Collins WF, Goldberger ME, Perl ER. 1980. Criteria for evaluating spinal cord regeneration experiments. *Surg Neurol* 14:392.
- Gwak YS, Crown ED, Unabia GC, Hulsebosch CE. 2008. Propentofylline attenuates allodynia, glial activation and modulates GABAergic tone after spinal cord injury in the rat. *Pain* 138:410-422
- Hall GF. 1999. PHF-Tau from Alzheimer brain is rapidly dephosphorylated and degraded when injected into neurons *in situ*. *J Alzheimers Dis* 1: 379-386.
- Hall GF, Chu B, Lee G, Yao J. 2000. Human tau filaments induce microtubule and synapse loss in an *in vivo* model of neurofibrillary degenerative disease. *J Cell Sci* 113: 1373-1387.
- Han N, Ding SJ, Wu T, Zhu YL. 2008. Correlation of free radical level and apoptosis after intracerebral hemorrhage in rats. *Neurosci Bull* 24:351-358.
- Hardisty MW. 1983. The significance of lampreys for biological research. *Endeavour* 7:110-115.
- Hardisty MW, Potter IC. 1971. The general biology of adult lampreys. In: Hardisty MW, Potter IC, editors. *The biology of lampreys*, vol 1. London: Academic Press. p 127-206.
- Hausmann ON. 2003. Post-traumatic inflammation following spinal cord injury. *Spinal Cord* 41:369-378.
- Higashijima S, Schaefer M, Fetcho JR. 2004. Neurotransmitter properties of spinal interneurons in embryonic and larval zebrafish. *J Comp Neurol* 480:19-37.
- Homma S, Rovainen CM. 1978. Conductance increases produced by glycine and gamma-aminobutyric acid in lamprey interneurons. *J Physiol* 279:231-252.
- Holstege JC. 1991. Ultrastructural evidence for GABAergic brain stem projections to spinal motoneurons in the rat. *J Neurosci* 11:159-167.
- Holstege JC, Bongers CM. A glycinergic projection from the ventromedial lower brainstem to spinal motoneurons. An ultrastructural double labeling study in rat. *Brain Res* 566:308-315.
- Honson NS, Jensen JR, Abraha A, Hall GF, Kuret J. 2009. Small-molecule mediated neuroprotection in an *in situ* model of tauopathy. *Neurotox Res*. 15:274-283.
- Huang AL, Chen X, Hoon MA, Chandrashekar J, Guo W, Treankner D, Ryba NJ, Zuker CS. 2006. The cells and logic for mammalian sour taste detection. *Nature* 442:934-938.
- Hubbs, C. L., Potter, I. C. 1971. Distribution, phylogeny and taxonomy. En "The Biology of Lampreys". Vol. 1. pp: 1-65. Hardisty, M. W. y Potter, I. C. (Eds.). Academic Press. London.
- Imboden M, Devignot V, Goblet C. 2001. Phylogenetic relationships and chromosomal location of five distinct glycine receptor subunit genes in the teleost *Danio rerio*. *Dev Genes Evol* 211:415-422.

- Ikedo Y, Nishiyama N, Saito H, Katsuki H. 1997. Furosemide-sensitive calcium rise induced by GABAA-receptor stimulation in cultures of embryonic rat striatal neurons. *Jpn J Pharmacol* 74:165-169.
- Jacobs AJ, Swain GP, Snedeker JA, Pijak DS, Gladstone LJ, Selzer ME. 1997. Recovery of neurofilament expression selectively in regenerating reticulospinal neurons. *J Neurosci* 17: 5206-5220.
- Jalalvand E, Robertson B, Wallén P, Grillner S. 2016. Ciliated neurons lining the central canal sense both fluid movement and pH through ASIC3. *Nat Commun.* 7:10002.
- Jalalvand E, Robertson B, Wallén P, Hill RH, Grillner S. 2014. Laterally projecting cerebrospinal fluid-contacting cells in the lamprey spinal cord are of two distinct types. *J Comp Neurol* 522:1753-1768.
- Jankowska E, Lund S, Lundberg A, Pompeiano O. 1968. Inhibitory effects evoked through ventral reticulospinal pathways. *Arch Ital Biol* 106:124-140.
- Janvier P. 2010. microRNAs revive old views about jawless vertebrate divergence and evolution. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107:19137-19138.
- Johnson JW, Ascher P. 1987. Glycine potentiates the NMDA response in cultured mouse brain neurons. *Nature* 325:529-531.
- Jonas P, Bischofberger J, Sandkühler J. 1998. Corelease of two fast neurotransmitters at a central synapse. *Science* 281:419-424.
- Kazatu Y, Akaike N, Kominaya S, Nabekura J. 1999. Regulation of intracellular chloride by cotransporters in developing lateral superior olive neurons. *J Neurosci* 19:2843-2851.
- Kirsch J, Betz H. 1998. Glycine-receptor activation is required for receptor clustering in spinal neurons. *Nature* 392:717-720
- Koyama H, Kishida R, Goris RC, Kusunoki T. 1989. Afferent and efferent projections of the VIIIth cranial nerve in the lamprey *Lampetra japonica*. *J Comp Neurol* 280:663-671.
- Kuratani S, Kuraku S, Murakami Y. 2002. Lamprey as an evo-devo model: lessons from comparative embryology and molecular phylogenetics. *Genesis* 34:175-183.
- Kuscha V, Barreiro-Iglesias A, Becker CG, Becker T. 2012. Plasticity of tyrosine hydroxylase and serotonergic systems in the regenerating spinal cord of adult zebrafish. *J Comp Neurol* 520:933-951.
- Langosch D, Becker CM, Betz H. 1990. The inhibitory glycine receptor: a ligand-gated chloride channel of the central nervous system. *Eur J Biochem* 194:1-8.
- Lee S, Kim W, Li Z, Hall GF. 2012. Accumulation of vesicle-associated human tau in distal dendrites drives degeneration and tau secretion in an in situ cellular tauopathy model. *Int J Alzheimers Dis* 2012:172837.

- Li WC, Perrins R, Walford A, Roberts A. 2003. The neuronal targets for GABAergic reticulospinal inhibition that stops swimming in hatchling frog tadpoles. *J Comp Physiol A* 189:29-37.
- Liu D, Thangnipon W, McAdoo D J. 1991. Excitatory amino acids rise to toxic levels upon impact injury to the rat spinal cord. *Brain Res* 547: 344–348.
- Liu D, Xu G Y, Pan E, McAdoo, D J. 1999. Neurotoxicity of glutamate at the concentration released upon spinal cord injury. *Neuroscience* 93: 1383–1389.
- Llinas R, Terzuolo CA. 1964. Mechanisms of supraspinal actions upon spinal cord activities. Reticular inhibitory mechanisms on alpha- extensor motoneurons. *J Neurophysiol* 27:579-59.
- LoTurco JJ, Owens DF, Heath MJ, Davis MB, Kriegstein AR. 1995. GABA and glutamate depolarize cortical progenitor cells and inhibit DNA synthesis. *Neuron* 15:1287-1298.
- Lukasiewicz PD. 1996. GABAC receptors in the vertebrate retina. *Mol Neurobiol.* 12:181-194.
- Lurie DI, Pijak DS, Selzer ME. 1994. Structure of reticulospinal axon growth cones and their cellular environment during regeneration in the lamprey spinal cord. *J Comp Neurol* 344: 559-580.
- Mackler SA, Selzer ME. 1985. Regeneration of functional synapses between individual recognizable neurons in the lamprey spinal cord. *Science.* 229, 774–776.
- Magoun HW, Rhines R. 1946. An inhibitory mechanism in the bulbar reticular formation. *J Neurophysiol* 27:579-591.
- Mallatt J, Winchell CJ. 2007. Ribosomal RNA genes and deuterostome phylogeny revisited: more cyclostomes, elasmobranchs, reptiles, and a brittle star. *Mol Phylogenet Evol* 43:1005-1022.
- Matsushima K, Kocho H, Watanabe R, Honda M, Nakamura N.1993. Diffuse cerebrospinal gliomatosis mimicking amyotrophic lateral sclerosis. *Intern Med* 32:476-479.
- Meisner JG, Marsh AD, Marsh DR. 2010. Loss of GABAergic interneurons in laminae I-III of the spinal cord dorsal horn contributes to reduced GABAergic tone and neuropathic pain after spinal cord injury. *J Neurotrauma* 27:729-737.
- Meléndez-Ferro M. 2001. Distribución de la inmunorreactividad al ácido gamma-aminobutírico (GABA) en el sistema nervioso de la lamprea de mar durante el desarrollo y en la etapa adulta. Tesis Doctoral. Universidad de Santiago de Compostela.
- Meléndez-Ferro M, Pérez-Costas E, González MJ, Pombal MA, Anadón R, Rodicio MC. 2000. GABA-immunoreactive internuclear neurons in the ocular motor system of lampreys. *Brain Res* 855:150-157.

- Meléndez-Ferro M, Pérez-Costas E, Rodríguez-Muñoz R, Gómez-López MP, Anadón R, Rodicio MC. 2001. GABA immunoreactivity in the olfactory bulbs of the adult sea lamprey *Petromyzon marinus* L. *Brain Res* 893: 253-260.
- Meléndez-Ferro M, Pérez-Costas E, Villar-Cheda B, Abalo XM, Rodríguez-Muñoz R, Rodicio MC, Anadón R. 2002. Ontogeny of gamma-aminobutyric acid-immunoreactive neuronal populations in the forebrain and midbrain of the sea lamprey. *J Comp Neurol* 446:360-376.
- Meléndez-Ferro M, Pérez-Costas E, Villar-Cheda B, Rodríguez-Muñoz R, Anadón R, Rodicio MC. 2003. Ontogeny of gamma-aminobutyric acid-immunoreactive neurons in the rhombencephalon and spinal cord of the sea lamprey. *J Comp Neurol* 464:17-35.
- Merrick SE, Pleasure SJ, Lurie DI, Pijak DS, Selzer ME, Lee VM. 1995. Glial cells of the lamprey nervous system contain keratin-like proteins. *J Comp Neurol* 355:199-210.
- Muller E, Le-Corronc H, Legendre P. 2008. Extrasynaptic and postsynaptic receptors in glycinergic and GABAergic neurotransmission: a division of labour? *Front Mol Neurosci* 1:3.
- Nieuwenhuys R. 1977. The brain of the lamprey in a comparative perspective. *Ann N Y Acad Sci* 299:97-145.
- Nieuwenhuys R, Nicholson C. 1998. Lampreys, Petromyzontoidea. In: Nieuwenhuys R, Donkelaar T, Nicholson C (eds). *The central nervous system of vertebrates*, vol. 1. Springer-Verlag, Berlin, pp 397-495.
- O'Brien JA, Berger AJ. 1999. Cotransmission of GABA and glycine to brain stem motoneurons. *J Neurophysiol* 82:1638-1641.
- O'Connell AW, Fox GB, Kjeller C, Gallagher HC, Murphy KJ, Kelly J, Regan CM. 2001. Anti-ischemic and cognition-enhancing properties of NNC-711, a gamma-aminobutyric acid reuptake inhibitor. *Eur J Pharmacol* 424:37-44.
- Ohta Y, Grillner S. 1989. Monosynaptic excitatory amino acid transmission from the posterior rhombencephalic reticular nucleus to spinal neurons involved in the control of locomotion in lamprey. *J Neurophysiol* 62:1079-1089.
- Oliphant PA, Alieva N, Foldes AE, Tytell ED, Lau BY, Pariseau JS, Cohen AH, Morgan JR. 2010. Regenerated synapses in lamprey spinal cord are sparse and small even after functional recovery from injury. *J Comp Neurol* 518: 2854-2872.
- Ooi EC, Youson JH. 1976. Growth of the opisthonephric kidney during larval life in the anadromous sea lamprey, *Petromyzon marinus* L. *Can J Zool* 54:1449-1458
- Osório J, Rétaux S. 2008. The lamprey in evolutionary studies. *Dev Genes Evol* 218:221-235.
- Owens DF, Kriegstein AR. 2002. Is there more to GABA than synaptic inhibition? *Nat. Rev. Neurosci* 3: 715-727.

- Panter SS, Yum SW, Faden AI. 1990. Alteration in extracellular amino acids after traumatic spinal cord injury. *Ann Neurol* 27:96–99.
- Parker, D. 2006. Complexities and uncertainties of neuronal network function. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* 361, 81–99.
- Parker, D. 2010. Neuronal network analyses: premises, promises and uncertainties. *Phil. Trans. R Soc B* 365, 2315–2328
- Perrins R, Walford A, Alan Roberts A. 2002. Sensory Activation and Role of Inhibitory Reticulospinal Neurons that Stop Swimming in Hatchling Frog Tadpoles. *J Neurosci* 22:4229–4240.
- Pombal MA, El Manira A, Grillner S. 1997. Afferents of the lamprey striatum with special reference to the dopaminergic system: a combined tracing and immunohistochemical study. *J Comp Neurol* 386:71-91.
- Pombal MA, López JM, de Arriba MC, Megias M, González A. 2006. Distribution of neuropeptide FF-like immunoreactive structures in the lamprey nervous system and its relation to catecholaminergic neuronal structures. *Peptides* 27:1054-1072.
- Pombal MA, Marin O, González A. 2001. Distribution of choline acetyltransferase-immunoreactive structures in lamprey brain. *J Comp Neurol* 431:105-126.
- Pombal MA, Rodicio MC, Anadon R. 1994. The Anatomy of the Vestibulo-Ocular System in Lampreys. En *Information Processing Underlying Gaze Control*. Delgado-García JM, Godaux E. and Vidal P P eds. Pergamon, Gran Bretaña pp 1-11.
- Purvis GP. 1979. Practical pointers: how time management got me under control. *Hosp Financ Manage* 33:42-44.
- Reichling DB, Basbaum AI. 1990. Contribution of brainstem GABAergic circuitry to descending antinociceptive controls: I. GABA-immunoreactive projection neurons in the periaqueductal gray and nucleus raphe magnus. *J Comp Neurol* 302:370-377.
- Reichenberger I, Dieringer N. 1994. Size-related colocalization of glycine and glutamate immunoreactivity in frog and rat vestibular afferents. *J Comp Neurol* 349:603-614.
- Reichenberger I, Straka H, Ottersen OP, Streit P, Gerrits NM, Dieringer N. 1997. Distribution of GABA, glycine, and glutamate immunoreactivities in the vestibular nuclear complex of the frog. *J Comp Neurol* 377:149-164.
- Reimer MM, Sörensen I, Kuscha V, Frank RE, Liu C, Becker CG, Becker T. 2008. Motor neuron regeneration in adult zebrafish. *J Neurosci* 28:8510–8516.
- Roberts A, Dale N, Ottersen OP, Storm-Mathisen J. 1987. The early development of neurons with GABA immunoreactivity in the CNS of *Xenopus laevis* embryos. *J Comp Neurol* 261:435-449.
- Roberts E, Frankel S. 1950. Gamma-aminobutyric acid in brain: its formation from glutamic acid. *J Biol Chem* 187:55-63

- Robertson B, Auclair F, Ménard A, Grillner S, Dubuc R. 2007. GABA distribution in lamprey is phylogenetically conserved. *J Comp Neurol* 503:47-63.
- Rodicio MC, Barreiro-Iglesias A. 2012. Las lampreas como modelo animal en estudios de regeneración tras lesión medular. *Rev Neurol* 55:157-66.
- Rodicio MC, Villar-Cerviño V, Abalo XM, Villar-Cheda B, Meléndez-Ferro M, Pérez-Costas E, Anadón R. 2005. Chemoarchitecture of the dorsal column nucleus of the larval sea lamprey. *Brain Res Bull* 66:536-540.
- Ronan M. 1989. Origins of the descending spinal projections in petromyzontid and myxinoïd agnathans. *J Comp Neurol* 281:54-68.
- Ronan M, Northcutt RG. 1990. Projections ascending from the spinal cord to the brain in petromyzontid and myxinoïd agnathans. *J Comp Neurol* 291:491-508.
- Rossignol S, Dubuc R, Gossard JP. 2006. Dynamic sensorimotor interactions in locomotion. *Physiol Rev* 86:89-154.
- Rouse DT Jr, McClellan, AD. 1997. Descending propriospinal neurons in normal and spinal cord-transected lamprey. *Exp. Neurol* 146, 113-124.
- Rovainen CM. 1967. Physiological and anatomical studies on large neurons of the central nervous system of sea lamprey (*Petromyzon marinus*). I. Müller and Mauthner cells. *J Neurophysiol* 30:1000-1023.
- Rovainen CM. 1976. Regeneration of Muller and Mauthner axons after spinal transection in larval lampreys. *J Comp Neurol* 168: 545-54.
- Rovainen CM. Neurobiology of lampreys. 1979. *Physiol Rev* 59:1007-1077.
- Rubinson K, Cain H. 1989. Neural differentiation in the retina of the larval sea lamprey (*Petromyzon marinus*). *Vis Neurosci* 3:241-248.
- Russier M, Kopysova IL, Ankri N, Ferrand N, Debanne D. 2002. GABA and glycine co-release optimizes functional inhibition in rat brainstem motoneurons in vitro. *J Physiol*
- Ruiz Y, Pombal MA, Megias M. 2004. Development of GABA immunoreactive cells in the spinal cord of the sea lamprey, *P. marinus*. *J Comp Neurol* 470: 151-163.
- Saransaari P, Oja SS. 1997. Enhanced GABA release in cell-damaging conditions in the adult and developing mouse hippocampus. *Int J Dev Neurosci* 15:163-174.
- Sagné C, El Mestikawy S, Isambert MF, Hamon M, Henry JP, Giros B, Gasnier B. 1997. Cloning of a functional vesicular GABA and glycine transporter by screening of genome databases. *FEBS Lett* 417:177-183.
- Schmitt DE, Hill RH, Grillner S. 2004. The spinal GABAergic system is a strong modulator of burst frequency in the lamprey locomotor network. *J Neurophysiol* 92:2357-2367.
- Selzer ME. 1978. Mechanisms of functional recovery and regeneration after spinal cord transection in larval sea lamprey. *J Physiol (Lond)* 277: 395-408.

- Sernagor E, Chabrol F, Bony G, Cancedda L. 2010. GABAergic control of neurite outgrowth and remodeling during development and adult neurogenesis: general rules and differences in diverse systems. *Front Cell Neurosci* 4:11.
- Shifman MI, Selzer ME. 2007. Differential expression of class 3 and 4 semaphorins and netrin in the lamprey spinal cord during regeneration. *J Comp Neurol* 501:6316-6346.
- Shifman MI, Zhang G, Selzer ME. 2008. Delayed death of identified reticulospinal neurons after spinal cord injury in lampreys. *J Comp Neurol* 510:269–282.
- Shupliakov O, Fagerstedt P, Ottersen OP, Storm-Mathiesen J, Grillner S, Brodin L. 1996. Immunocytochemical localization of glycine in the lamprey spinal cord with reference to GABAergic and glutamatergic synapses: a light and electron microscopic study. *Acta Biol Hung* 47:393-410.
- Stamp JA, Semba K. 1995. Extent of colocalization of serotonin and GABA in the neurons of the rat raphe nuclei. *Brain Res* 677:39-49.
- Stefanelli A. 1934. I centri tegmentali dell'encefalo dei Petromizonti. *Arch Zool Ital* 20:117–202.
- Svensson E, Kim O, Parker D. 2013. Altered GABA and somatostatin modulation of proprioceptive feedback after spinal cord injury in lamprey. *Neuroscience* 235:109–118.
- Swain GP, Snedeker JA, Ayers J, Selzer ME. 1993. Cytoarchitecture of spinal-projecting neurons in the brain of the larval sea lamprey. *J Comp Neurol* 336:194-210.
- Takezaki N, Figueroa F, Zaleska-Rutczynska Z, Klein J. 2003. Molecular phylogeny of early vertebrates: monophyly of the agnathans as revealed by sequences of 35 genes. *Mol Biol Evol* 20:287-292.
- Tegnér J, Matsushima T, el Manira A, Grillner S. 1993. The spinal GABA system modulates burst frequency and intersegmental coordination in the lamprey: differential effects of GABAA and GABAB receptors. *J Neurophysiol* 69:647-657.
- Tillakaratne NJ, Mouria M, Ziv NB, Roy RR, Edgerton VR, Tobin AJ. 2000. Increased expression of glutamate decarboxylase (GAD (67)) in feline lumbar spinal cord after complete thoracic spinal cord transection. *J Neurosci Res* 60: 219-230.
- Uematsu H, Popescu A, Zhang G, Wright AC, Wehrli SL, Takahashi M, Wehrli FW, Selzer ME, Hackney DB. 2004. Magnetization transfer micro-MR imaging of live excised lamprey spinal cord: characterization and immunohistochemical correlation. *AJNR Am J Neuroradiol* 25:1816-1820.
- Veselkin NP, Adanina VO, Rio JP, Repérant J. 2000. Colocalization of neurotransmitters in presynaptic boutons of inhibitory synapses in the lamprey spinal cord. *Neurosci Behav Physiol* 30:547-552.
- Vidal Pizarro I, Swain GP, Selzer ME. 2004. Cell proliferation in the lamprey central nervous system. *J Comp Neurol* 469: 298-310.

- Vigh B, Manzano e , Silva MJ, Frank CL, Vincze C, Czirok SJ, Szabó A, Lukáts A, Szél A. 2004. The system of cerebrospinal fluid-contacting neurons. Its supposed role in the nonsynaptic signal transmission of the brain. *Histopathol* 19:607–628.
- Villar-Cerviño V, Abalo XM, Villar-Cheda B, Meléndez-Ferro M, Pérez-Costas E, Holstein GR, Martinelli GP, Rodicio MC. 2006. Presence of glutamate, glycine and gamma-aminobutyric acid in the retina of the larval sea lamprey: comparative immunohistochemical study of classical neurotransmitters in larval and postmetamorphic retinas. *J Comp Neurol* 499:810-827.
- Villar-Cerviño V, Barreiro-Iglesias A, Anadón R, Rodicio MC. 2008a. Distribution of glycine immunoreactivity in the brain of adult sea lamprey (*Petromyzon marinus*). Comparison with gamma-aminobutyric acid. *J Comp Neurol* 507:1441-1463.
- Villar-Cerviño V, Barreiro-Iglesias A, Anadón R, Rodicio MC. 2009. Development of glycine immunoreactivity in the brain of the sea lamprey: comparison with gamma-aminobutyric acid immunoreactivity. *J Comp Neurol* 20;512:747-767.
- Villar-Cerviño V, Barreiro-Iglesias A, Fernández-López B, Mazan S, Rodicio MC, Anadón R. 2013. Glutamatergic neuronal populations in the brainstem of the sea lamprey, *Petromyzon marinus*: an in situ hybridization and immunocytochemical study. *J Comp Neurol* 521:522-557.
- Villar-Cerviño V, Holstein GR, Martinelli GP, Anadón R, Rodicio MC. 2008b. Glycine-immunoreactive neurons in the developing spinal cord of the sea lamprey: comparison with the gamma-aminobutyric acidergic system. *J Comp Neurol* 508:112-130.
- Wang J, Reichling DB, Kyzozis A, MacDermott AB. 1994. Developmental loss of GABA- and glycine-induced depolarization and Ca²⁺ transients in embryonic rat dorsal horn neurons in culture. *Eur J Neurosci.* 6:1275-1280.
- Wanner T, Orlovsky G, Grillner S. 1995. Reticulospinal neurons provide monosynaptic glycinergic inhibition of spinal neurons in lamprey. *Neural Netw* 11:1005-1015.
- Wannier T, Orlovsky G, Grillner S. 1995. Reticulospinal neurones provide monosynaptic glycinergic inhibition of spinal neurones in lamprey. *Neuroreport* 6:1597–1600.
- Wickelgren WO. 1977. Physiological and anatomical characteristics of reticulospinal neurons in lamprey. *J Physiol* 270:89-114.
- Wood PL. 2005. The NMDA receptor complex: a long and winding road to therapeutics. *IDrugs* 8:229-235.
- Wood MR, Cohen MJ. 1979. Synaptic regeneration in identified neurons of the lamprey spinal cords. *Science* 206: 344-347.
- Yang Y, Li Q, Wang CX, Jeerakathil T, Shuaib A. 2000. Dose-dependent neuroprotection with tiagabine in a focal cerebral ischemia model in rat. *Neuroreport* 11:2307–2311.
- Yin HS, Selzer ME. 1983. Axonal regeneration in lamprey spinal cord. *J Neurosci* 3: 1135–1144.

Young AB, Snyder SH. 1974. Strychnine binding in rat spinal cord membranes associated with the synaptic glycine receptors: cooperativity of glycine interactions. *Mol Pharmacol* 10:790-809.

Zafra F, Giménez C. 2008. Glycine transporters and synaptic function. *IUBMB Lif* 6:810-817.

Zhang AL, Hao JX, Seiger A, Xu XJ, Wiesenfeld-Hallin Z, Grant G, Aldskogius H. 1994. Decreased GABA immunoreactivity in spinal cord dorsal horn neurons after transient spinal cord ischemic in the rat. *Brain Res* 656:187-190.

Zhang G, Vidal Pizarro I, Swain GP, Kang SH, Selzer M E. 2014. Neurogenesis in the lamprey central nervous system following spinal cord transection. *J Comp. Neurol* 522: 1316–1332.





PUBLICACIONES

Los resultados correspondientes al estudio de las proyecciones inhibitorias descendentes han sido publicados en el siguiente artículo:

Valle-Maroto SM, Fernández-López B, Villar-Cerviño V, Barreiro-Iglesias A, Anadón R, Rodicio MC. 2011. Inhibitory descending rhombencephalic projections in larval sea lamprey. *Neuroscience*. 194:1-10

El estudio de los cambios agudos en respuesta a la lesión de los sistemas de neurotransmisores inhibidores ha sido publicado conjuntamente con el estudio de los cambios agudos en el sistema glutamatérgico y han sido recogidos en el siguiente artículo:

Fernández-López B, **Valle-Maroto SM**, Barreiro-Iglesias A, Rodicio MC. 2014. Neuronal release and successful astrocyte uptake of aminoacidergic neurotransmitters after spinal cord injury in lampreys. *Glia*. 62:1254-1269.

En él que Fernández-López B y Valle-Maroto SM han participado por igual.

El estudio de los cambios en el sistema GABAérgico durante la regeneración, junto con los cambios en la expresión del receptor metabotrópico de GABA1B, estudiados por Daniel Romaus Sanjurjo como parte de su tesis doctoral, dirigida por los doctores A Barreiro-Iglesias y MC Rodicio, va a ser recogido en el siguiente artículo:

Romaus-Sanjurjo D, **Valle-Maroto SM**, Barreiro-Iglesias A, Fernández-López B, Rodicio MC. Changes in the expression of GABA and the GABA B receptor in the spinal cord of lampreys during the regeneration after a spinal lesion que está terminando de prepararse para su envío a *Neuropharmacology*.

El estudio de los cambios en el sistema glicinérgico piensa publicarse junto con el análisis de los cambios producidos en la médula espinal después de un tratamiento con glicina.



