

Análisis ultraestructural del músculo *levator auris longus* de ratón intoxicado *in vivo* por la neurotoxina botulínica tipo A.

Elena Velasco¹, Teresa Gledhill¹, Cristhian Linares² y Antonio Roschman-González³.

¹Laboratorio de Microscopía Electrónica, Escuela de Medicina “José María Vargas”
Facultad de Medicina, Universidad Central de Venezuela,

²Postgrado de Toxicología, Hospital Leopoldo Manrique Terrero y

³Postgrado de Zoología Tropical, Facultad de Ciencias, Universidad Central de
Venezuela. Caracas. Venezuela.

Palabras clave: Toxina botulínica, ultraestructura, placa motora, célula muscular.

Resumen. En este estudio investigamos los cambios ultraestructurales a corto y largo plazo provocados por la toxina botulínica tipo A inyectada a dosis sub-letales *in vivo* en el *levator auris longus* de ratones. La neurotoxina actuó temporalmente sobre los terminales nerviosos e indujo una parálisis generalizada que afectó la morfología de la preparación neuromuscular estudiada influyendo sobre: tamaño y complejidad de la terminación nerviosa, población vesicular, apariencia de las mitocondrias, fisonomía de las células de Schwann, desarrollo y distribución de los pliegues de la membrana postsináptica, y morfología de los núcleos de los diferentes elementos de la placa motora. Además, la cantidad de tejido conectivo endomisial aumentó significativamente con relación a los casos control, siendo estos cambios marcados en las primeras semanas. Entre los 20 y 25 días, período correspondiente al proceso de recuperación observamos terminales nerviosos de apariencia variable, unos completamente degenerados rodeados por restos de prolongaciones de células de Schwann y otros nuevos contactos caracterizados ultraestructuralmente por su pequeño calibre y población vesicular escasa, rodeadas parcialmente por la célula de Schwann, axones tempranamente mielinizados, pliegues sinápticos escasamente desarrollados. Sesenta días posteriores a la inyección, el axón terminal recobró su apariencia normal: las vesículas sinápticas llenaban el axoplasma, las mitocondrias exhibían crestas y densidades electrónicas de apariencia habitual. Se puede concluir que la toxina botulínica tipo A provoca fenómenos de desnervación en el nervio terminal y en los componentes de la placa motora. Las células de Schwann juegan un papel importante en la recuperación morfofuncional de los terminales nerviosos y en su degradación.

Ultrastructural analysis of mouse *levator auris longus* muscle intoxicated *in vivo* by botulinum neurotoxin type A.

Invest Clin 2008; 49(4): 469 - 486

Key words: Botulinum toxin, ultrastructure, motor end plate, muscle cell.

Abstract. We studied the short and long term ultrastructural changes produced by botulinum neurotoxin type A injected *in vivo*, at a sublethal dose, in mouse levator auris longus muscle. The neurotoxin had a temporary effect on nerve terminals which consisted in a generalized paralysis, that affected the following features of the neuromuscular sample's morphology: size of the nerve terminals, vesicle population, mitochondrial appearance, Schwann cell's morphology, development and distribution of post-synaptic membrane folds, and nuclear morphology of the different elements of the motor end plate. Besides, the amount of endomysial connective tissue was significantly greater compared to non-intoxicated cases, and these changes were more notorious during the first couple of weeks. 20 to 25 days after the injection, during the recovery phase, we observed nerve terminals with a variable appearance: some completely degenerated, enveloped by Schwann cell processes, and new contacts characterized ultrastructurally for their small size, scarce vesicles, partially enveloped by Schwann cells, early myelinated axons and barely developed synaptic folds. Sixty days after the injection, the axon terminal recovered its normal appearance: synaptic vesicles filled the axon's cytoplasm, and the mitochondria showed normal appearing cristae and electronic densities. We conclude that botulinum neurotoxin type A produces changes related to denervation of the nerve terminals and affects the motor end plate components. Schwann cells play an important role both in the morphofunctional recovery of nerve terminals and in their degradation

Recibido: 07-09-2007. Aceptado: 27-03-2008.

INTRODUCCIÓN

El estudio de las sustancias neurotóxicas representa una valiosa herramienta en el campo de la investigación morfofisiológica, sobre todo, para el análisis de los mecanismos de transmisión sináptica (1,2). Muchos de los progresos en la neurobiología son el resultado de la utilización de neurotoxinas, las cuales interactúan en forma específica con macromoléculas funcionales, canales de Na⁺ y K⁺ presentes en la membrana plasmática (3-5). Durante las últimas décadas, numerosos avances en este campo

han surgido de experimentos realizados con neurotoxinas producidas por animales marinos, serpientes, abejas, escorpiones, entre otros (6-10).

El análisis de las neurotoxinas no se ha limitado solamente a la investigación básica, sino que ha sido asiento de numerosas aplicaciones terapéuticas, tal es el caso de la toxina botulínica, y de otras sustancias curarizantes, que han sido utilizadas en el tratamiento de diferentes desórdenes neurológicos (11-14). Un estudio reciente de las conotoxinas evidencia que pueden actuar como agente terapéutico

para la isquemia cerebral y como analgésicos eficaces (6, 7).

Las toxinas botulínicas son los agentes responsables de una enfermedad poco frecuente conocida como botulismo. Estas proteínas bicatenarias, producidas por bacterias anaeróbicas gram positivas del género *Clostridium*, se agrupan en siete serotipos diferentes (A-G), según sus propiedades antigénicas. Se describen tres variantes epidemiológicas de botulismo en el hombre: *botulismo alimentario* (serotipos A, B, E producidos por *C. botulinum* y *C. butyricum*, y excepcionalmente, el serotipo F), *botulismo infantil*, toxi-infección producida por la colonización del intestino principalmente por el serotipo B, y el *botulismo de inoculación*, en el que prevalecen los serotipos A y B (15, 16). Las toxinas botulínicas actúan esencialmente sobre el sistema nervioso periférico, afectando la transmisión colinérgica entre: las neuronas pre y post-ganglionares, las neuronas post-ganglionares del sistema nervioso parasimpático y sus efectores, las terminaciones motoras colinérgicas y las fibras musculares. El mecanismo de acción celular de las neurotoxinas botulínicas, según el trabajo pionero de Lance Simpson realizado en la década de los 80, comprende tres etapas: unión, internalización y acción intraneuronal (15-20). La cadena pesada de la neurotoxina permite la unión a receptores específicos (gangliósidos y proteínas asociadas a vesículas sinápticas conocidas como sinaptotagminas) seguido de la internalización por endocitosis del complejo toxina botulínica / receptor. El reciclaje vesicular induce la internalización de las toxinas. Posteriormente, la cadena liviana de la neurotoxina (metaloproteinasa dependiente de Zn^{2+}) experimenta translocación hacia el citosol, donde se une a una o más de las proteínas SNARE (SNAP-25, VAMP-sinaptobrevina y sintaxina), que participan en la fusión de las vesículas sinápticas en los sitios de liberación,

inhibiendo así, la exocitosis dependiente de Ca^{2+} de los neurotransmisores (15-20). La duración del efecto neuromuscular de las neurotoxinas está determinado por el recambio de las proteínas sinápticas, la vida media de la cadena liviana de la toxina en el citosol, y el crecimiento de nuevos terminales nerviosos. En este sentido, la toxina botulínica tipo A no sólo induce parálisis de los músculos esqueléticos de mamíferos, sino que además, dispara *in vivo* un crecimiento de los terminales nerviosos, contribuyendo así, a la recuperación funcional del músculo; estos hallazgos han sido utilizados para interpretar las interrelaciones tróficas existentes entre el terminal nervioso y las células musculares (15, 16, 19, 21-24).

Ciertas preparaciones neuromusculares aisladas de mamíferos (diafragma, *levator auris longus*, soleus) han sido ampliamente utilizadas en estudios morfológicos, bioquímicos y electrofisiológicos. El músculo *levator auris longus* (LAL) en murinos, descrito por Angaut-Petit en 1989, representa un modelo ideal para estudios morfológicos sustentados sobre efectos a corto y a largo plazo de drogas y/o toxinas (25). Esta preparación neuromuscular tiene la ventaja de poseer las terminaciones y ramificaciones nerviosas perfectamente visibles debido a sus características anatómicas.

En este trabajo, nos proponemos evaluar el grado de respuesta del nervio terminal del músculo LAL de ratón tras suministrar una dosis sub-letal de toxina botulínica tipo A, para así, caracterizar los daños a nivel ultraestructural de los elementos constituyentes de la sinapsis y de la célula muscular.

MATERIALES Y MÉTODOS

Los experimentos se llevaron a cabo en ratones machos suizos de pesos comprendidos entre 20 y 25 g, quienes fueron inyectados localmente *in vivo* a razón de 0,45 μ g de *Clostridium botulinum* tipo-A, y poste-

riormente, sacrificados por dislocación cervical durante períodos comprendidos entre 5 y 60 días. El músculo LAL de localización cervical fue utilizado para los estudios ultraestructurales, siendo aislada la preparación neuromuscular en una solución Ringer- Krebs burbujeada con oxígeno a fin de mantener su integridad fisiológica. Los músculos aislados y desprovistos de tejido conectivo fueron fijados en glutaraldehído al 2,5% en una solución Buffer fosfato (pH 7,4) y post-fijados con tetróxido de osmio al 2% disuelto en el mismo buffer. Las preparaciones fueron deshidratadas en etanol en concentraciones crecientes y embebidas en Epon 812. Pequeñas regiones del tejido conteniendo minúsculas ramas nerviosas terminales fueron seleccionadas para elaborar los bloques de inclusión a los que posteriormente, se les realizaron cortes semi-finos coloreados con azul de toluidina (1%) y examinados al microscopio de luz a fin de localizar las placas motoras. Se realizaron cortes ultrafinos de las placas seleccionadas, se contrastaron con soluciones de acetato de uranilo y citrato de plomo, respectivamente, y finalmente fueron examinadas en un microscopio de transmisión Jeol 1011 con una cámara marca Gatan incorporada lo cual permitió digitalizar en forma directa las imágenes ultraestructurales. Con el uso del programa Image Tool versión 2.0 se cuantificaron los perímetros de los terminales axónicos, población vesicular, número de mitocondrias, número y profundidad de los pliegues sinápticos. Con el programa Statistica versión 7.0 se realizaron pruebas de análisis de la varianza (ANOVA), y pruebas *a posteriori* de Duncan, con una significancia de 5%.

RESULTADOS

El análisis cito-arquitectural de los elementos pre y post-sinápticos de los sistemas muscular y nervioso reveló la presencia de

terminales nerviosos degenerados y neoformados, además de células musculares con rasgos degenerativos.

Al aplicar la neurotoxina localmente *in vivo* a nivel del músculo LAL, (localizado en la región superficial entre la línea media del cuello y la base de la oreja) se produjo dentro de las 24 horas siguientes, una postración completa de los animales de experimentación aunado a la pérdida de apetito, condición que podía durar entre dos a tres semanas. La parálisis parcial o total de los animales de experimentación se debió al bloqueo producido en la región presináptica, al inhibir la liberación de quantum de acetilcolina responsables de transmitir el estímulo nervioso a la célula muscular. Esta interrupción provocó una serie de cambios en los componentes de la placa motora.

El análisis ultraestructural de la placa motora –zona diferenciada de contacto entre el axón desprovisto de mielina y la célula muscular– evidenció en los animales control, tres componentes celulares: A nivel pre-sináptico, terminales nerviosos amielínicos estrechamente asociados a la célula de Schwann, caracterizados por la presencia de numerosas vesículas sinápticas pequeñas ($140 \pm 20/\mu\text{m}^2$) de centro electrón-lúcido y diámetros cercanos a los 50 nm cargadas en su interior con el neurotransmisor (acetilcolina), y abundantes mitocondrias de diámetros de $0,39 \pm 0,03 \mu\text{m}$. A nivel post-sináptico, se observaron invaginaciones subsarcolémicas de la célula muscular (pliegues sinápticos), sitios de anclaje de numerosos receptores nicotínicos a la acetilcolina. Estos pliegues subsarcolémicos se encontraron en un número promedio de 21 ± 3 , con una profundidad de $1,64 \pm 0,16 \mu\text{m}$ y un perímetro total de $68,02 \pm 5,02 \mu\text{m}$. Entre ambas regiones se delimitó un espacio denominado frente sináptico de aproximadamente 60 nm de espesor, que contenía la lámina basal (Fig. 1).

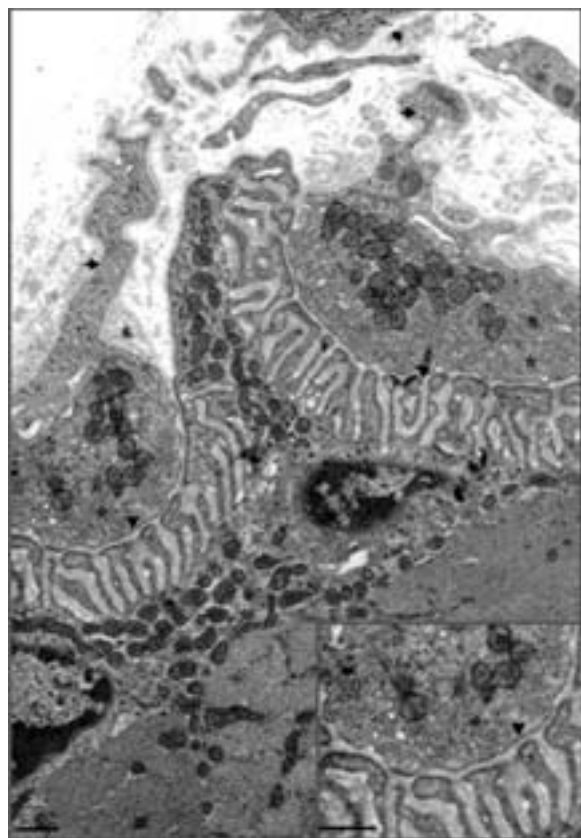


Fig. 1. Micrografía electrónica de sección transversa de terminales nerviosos del músculo LAL control. Se observan prolongaciones de la célula de Schwann (flechas) rodeando a los terminales axónicos que se caracterizan por presentar abundantes mitocondrias (m) y organelos secretorios pequeños y claros las denominadas vesículas sinápticas (asterisco). La región postsináptica se caracteriza por mostrar abundantes y profundas invaginaciones (pliegues sinápticos) (cabeza de flecha) Bar: 0.89 μm . Fig. 1-a Con mayor detalle se evidencian los elementos descritos en la figura anterior. Bar: 1.93 μm .

Al comparar los elementos constituyentes de las terminaciones nerviosas del músculo *levator auris longus* control con los tratados con la toxina botulínica se observó que existían diferencias ultraestructurales apreciables en cuanto a: complejidad

de la terminación nerviosa, población vesicular, apariencia y número de las mitocondrias, fisonomía de las células de Schwann, grado de desarrollo y distribución de los pliegues de la membrana postsináptica, así como la morfología de los núcleos de los diferentes elementos constituyentes de la placa motora, además, la cantidad de fibras colágenas del tejido conectivo endomisial aumentó con relación a los casos control.

Cinco días después de inyectar la toxina botulínica, los terminales nerviosos estudiados mostraron variación significativa de la población vesicular (Tabla I), constatándose disminución en un 85% de las vesículas pequeñas electron-lúcidas (densidad vesicular de 66 ± 12 vesículas/ μm^2) y aparición de grandes vesículas de centro denso (dense-core vesicles), con un diámetro variable entre 80 y 150 nm, dispuestas aisladas y/o en pequeños acúmulos de dos o más vesículas. Los organelos mitocondriales mostraron variaciones en su diámetro que osciló entre 0,40 y 0,80 μm , así como en su número y densidad electrónica.

Las células de Schwann mostraron abundantes ribosomas aislados o formando parte del RER, núcleos de gran tamaño con irregularidades profundas en sus membranas y cromatina densa formando grumos dispersos en el nucleoplasma, además de numerosas prolongaciones circundando al terminal nervioso. Algunas células musculares evidenciaron pérdida de la organización de los pliegues subsarcolémicos y sus núcleos mostraron las mismas características ultraestructurales descritas para las células de Schwann, no obstante el sistema contráctil lució un aspecto normal (Figs. 2-4). El número de pliegues subsarcolémicos disminuyó a 9 ± 1 , correspondiente a un 54%; su profundidad y perímetro también se vieron afectados disminuyendo a $1,0 \pm 0,1 \mu\text{m}$ y $22,68 \pm 5,83 \mu\text{m}$, respectivamente. Todas estas variaciones morfométricas fueron estadísticamente significativas (Tabla I).

TABLA I
ANÁLISIS DE LA VARIANZA*

Análisis de la Varianza (ANOVA)	Valores de P de las pruebas <i>a posteriori</i> de Duncan				
Perímetro de los pliegues (μm)	5 Días	12 Días	20 Días	60 Días	Control
F = 5,63	12 Días	0,817	0,302	0,080*	0,008*
P = 0,003*	20 Días		0,321	0,033*	0,003*
n = 48	60 Días			0,008*	0,001*
					0,199
Profundidad de los pliegues (μm)	5 Días	12 Días	20 Días	60 Días	Control
F = 6,82	12 Días	0,676	0,550	0,0038*	0,004*
P = 0,000*	20 Días		0,307	0,060*	0,005*
n = 150	60 Días			0,014*	0,001*
					0,771
Numero de pliegues	5 Días	12 Días	20 Días	60 Días	Control
F = 3,61	12 Días	0,981	0,547	0,035*	0,024*
P = 0,012*	20 Días		0,506	0,029*	0,001*
n = 48	60 Días			0,014*	0,000*
					0,832
#Ves/ μm^2	5 Días	12 Días	20 Días	60 Días	Control
F = 2,71	12 Días	0,785	0,838	0,024*	0,040*
P = 0,032*	20 Días		0,650	0,014*	0,002*
n = 162	60 Días			0,039*	0,007*
					0,227
Diámetro de las mitocondrias	5 Días	12 Días	20 Días	60 Días	Control
F = 7,63	12 Días	0,569	0,237	0,005*	0,003*
P = 0,00*	20 Días		0,3564	0,002*	0,005*
n = 168	60 Días			0,002*	0,001*
					0,256

*Las P < 0,05 indican diferencias estadísticamente significativas.

Estos mismos rasgos de desorganización se manifestaron doce días después de la inyección. Algunos terminales nerviosos mostraron una población vesicular adecuada entremezclada con mitocondrias que presentaban densidades electrónicas diferentes; otros, por el contrario, reflejaron signos de pérdida completa de su población vesicular, los pliegues sinápticos sobresalieron por su gran tamaño y con numerosas irregularidades debido a la atrofia de la célula muscular. El sistema contráctil tenía una apariencia normal con algunos focos de hinchamiento de los elementos del sistema membranoso y de los organelos mitocondriales, estos últimos con tendencia a for-

mar figuras mielínicas y glucogenosomas (Figs. 5 y 6).

Entre los 20 y 25 días, período correspondiente al proceso de recuperación de los animales de experimentación, se observaron imágenes de terminales nerviosos de apariencia variable. Unos terminales completamente degenerados rodeados por restos de prolongaciones pertenecientes a procesos de células de Schwann (Figs. 7 y 8), y otros nuevos contactos caracterizados ultraestructuralmente por ser de menor complejidad, con población vesicular escasa ($72,50 \pm 7,50$ vesículas/ μm^2), mitocondrias con un diámetro promedio de $0,27 \pm 0,03$ μm rodeadas parcialmente por la célula de

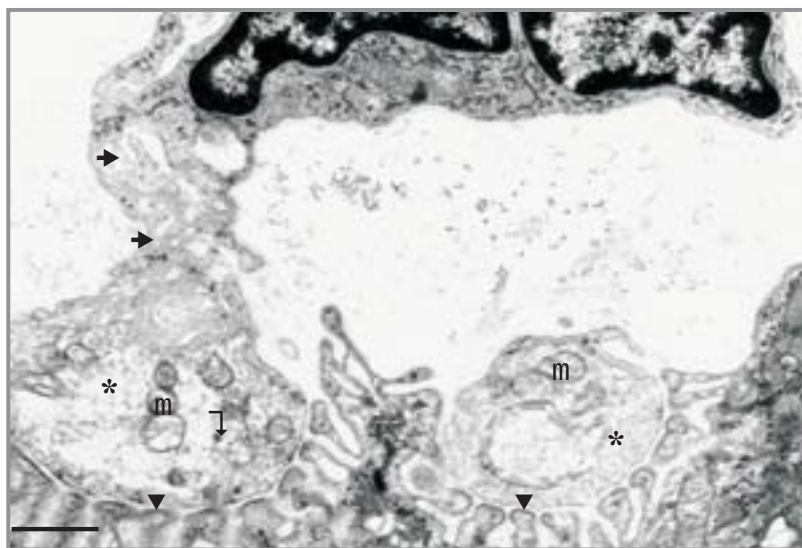


Fig. 2. Micrografía electrónica de sección transversa de terminales nerviosos del músculo LAL, 5 días posteriores a la inyección de toxina botulínica tipo A. Se observa complejidad de los procesos de la célula de Schwann que entornan a los terminales axónicos (flechas). La población mitocondrial se observa disminuida y con pérdida de su densidad electrónica (m). Una disminución de la población de vesículas electrón transparentes (asterisco) y la aparición de grandes organelos con centro electrón denso (flecha curva). La región postsináptica se caracteriza por mostrar invaginaciones (pliegues sinápticos) menos profundas (cabeza de flecha). Bar: 1.6 μ m.

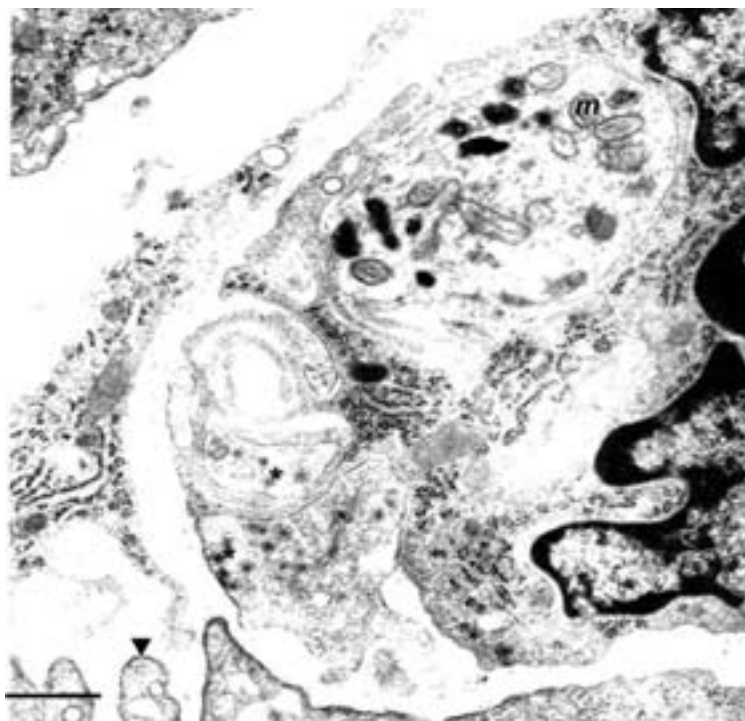


Fig. 3. Micrografía electrónica de detalle de una terminación nerviosa del músculo LAL, 5 días posteriores a la inyección de toxina botulínica tipo A. Se observan la aparición de vesículas de centro denso (asterisco), mitocondrias con densidades electrónicas diferentes (m) y pérdida de la organización de los elementos constituyentes de la unión neuromuscular (cabeza de flecha). Bar: 2 μ m.

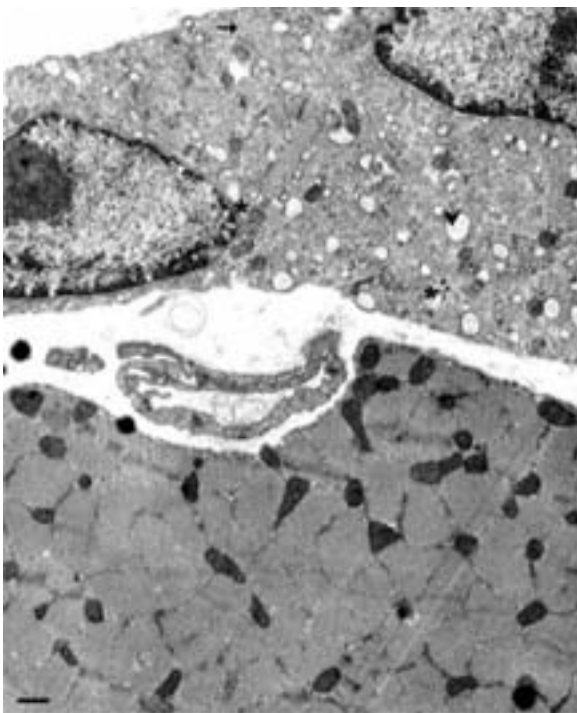


Fig. 4. Micrografía electrónica de detalle de células musculares LAL, 5 días posteriores a la inyección de toxina botulínica tipo A. En la parte superior la célula muscular muestra pérdida de la organización del sistema contráctil (flecha) y el retículo sarcoplásmico visiblemente hinchado (cabeza de flecha), y la presencia de estructuras lamelares (asterisco). En contraste la célula muscular inferior, no se ve visiblemente afectada. Bar: $0,78\ \mu\text{m}$.

Schwann, axones tempranamente mielinizados, pliegues sinápticos escasos (7 ± 2), poco desarrollados con un perímetro promedio de $9,88 \pm 1,74\ \mu\text{m}$ y una profundidad de $0,86 \pm 0,19\ \mu\text{m}$, o incluso ausentes (Figs. 9-10).

Por otro lado, algunas células musculares expuestas a la neurotoxina en este periodo mostraron signos evidentes de degeneración que se manifestaron por atrofia severa, pérdida de su organización, organelos mitocondriales con tendencia a formar figuras mielínicas y abundantes glucogenosomas (Fig. 11); otras presentaron alteracio-

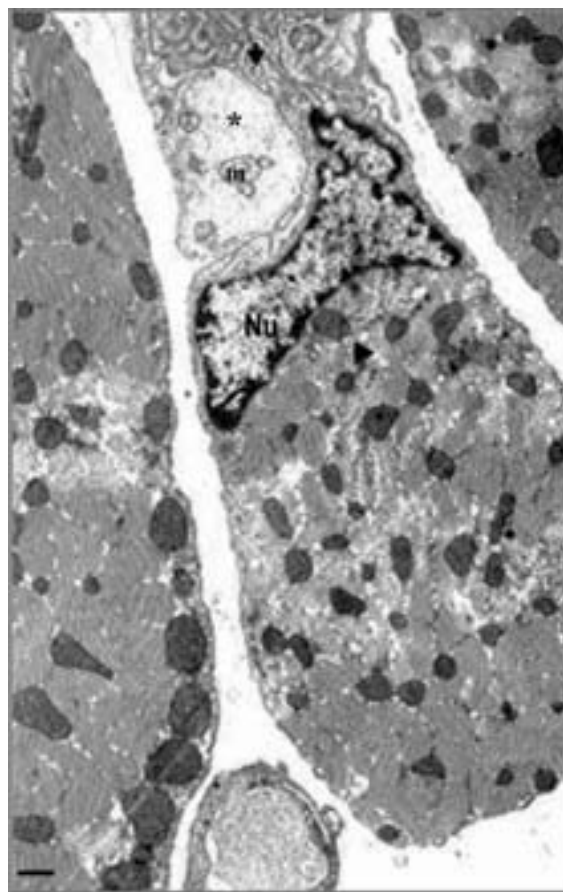


Fig. 5. Micrografía electrónica de sección transversa de terminales nerviosos del músculo LAL, 12 días posteriores a la inyección de toxina botulínica tipo A. Se muestra un terminal axónico visiblemente desprovisto de población vesicular (asterisco), con escasas mitocondrias alteradas (m). La región postsináptica muestra pliegues complejos debido a la orientación del corte (flecha), los elementos de la célula muscular muestran retículo sarcoplásmico hinchado (cabeza de flecha) y núcleos conspicuos (Nu). Bar: $0,85\ \mu\text{m}$.

nes a nivel del retículo endoplásmico liso con sistema contráctil indemne donde se destacan los núcleos pleomórficos de gran tamaño y nucleolos evidentes (Fig. 12).

Sesenta días posteriores a la inyección de la toxina botulínica el axón terminal recobró su apariencia normal: las vesículas si-

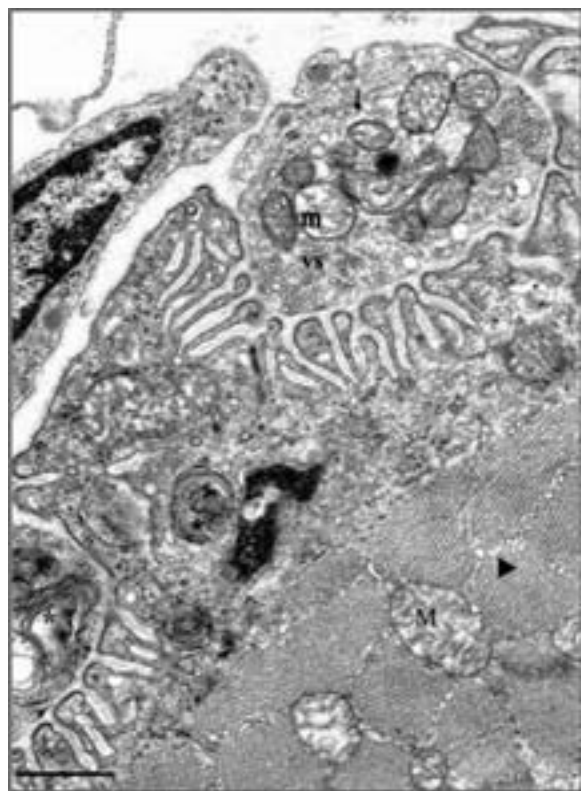


Fig. 6. Micrografía electrónica de sección transversa de terminales nerviosos del músculo LAL, 12 días posteriores a la inyección de toxina botulínica tipo A. En el terminal nervioso superior (flecha) se observan mitocondrias con densidades electrónicas variables (m) y abundantes vesículas sinápticas (vs). En el terminal axónico inferior y en la célula muscular (cabeza de flecha) se observan figuras mielínicas (asterisco) y mitocondrias con diferentes grados de degeneración (M). Bar: 1.74 μm .

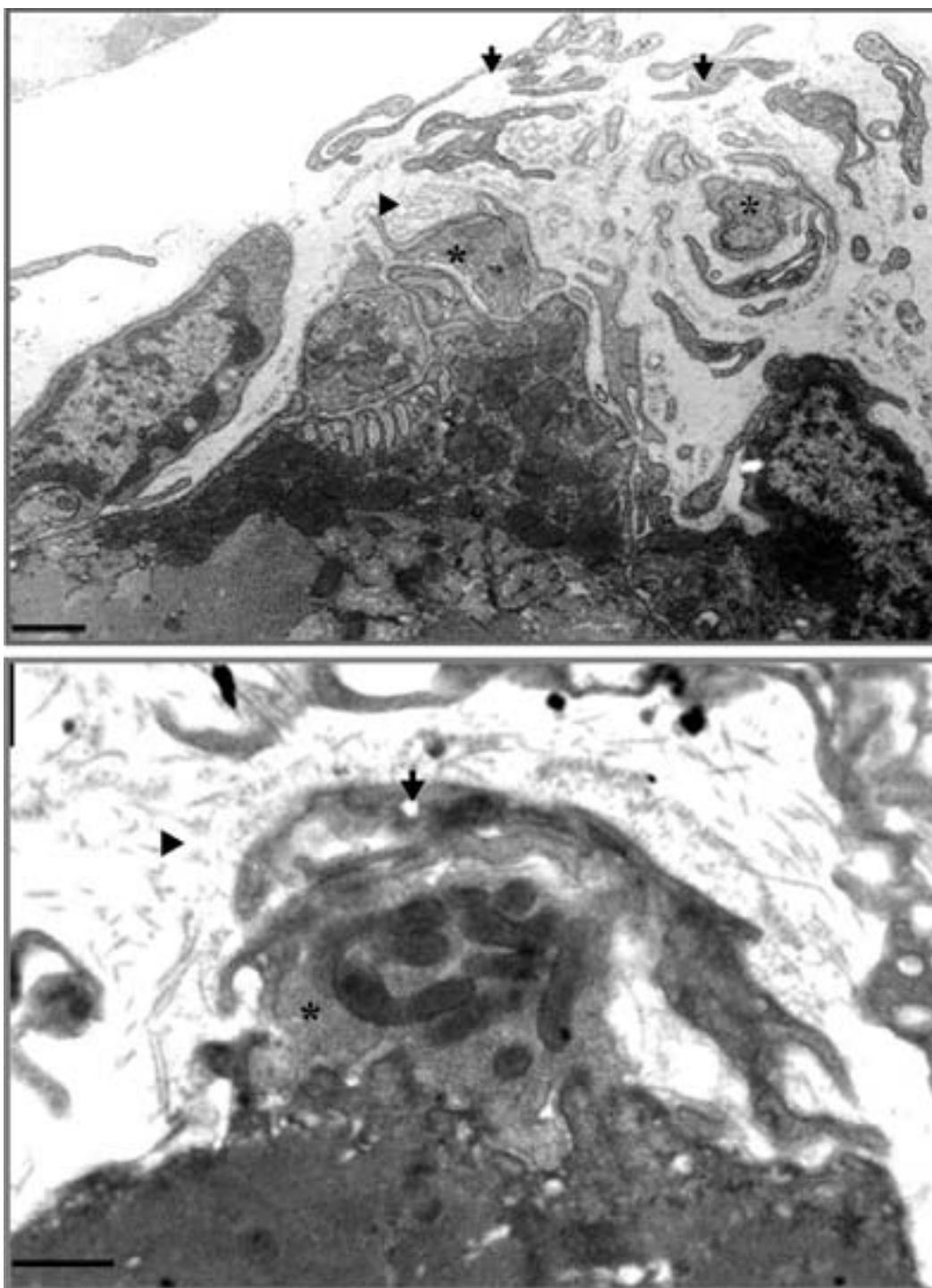
nápticas llenaron el axoplasma con una densidad de 100 ± 12 vesículas/ μm^2 , las mitocondrias exhibieron crestas y densidades electrónicas de apariencia habitual con diámetros promedios de 0,48 a 0,36 μm ; la región postsináptica evidenció pliegues similares a los analizados para el control (Tabla I), con un perímetro de $49,31 \pm 2,69$ μm y una profundidad promedio de $1,57 \pm 0,06 \mu\text{m}$ (Figs. 13 y 14).

DISCUSIÓN

El conocimiento del mecanismo de acción de las sustancias curarizantes y las neurotoxinas botulínicas sobre la unión neuromuscular ha permitido no sólo definir sus particularidades estructurales, sino comprender los procesos de neurotransmisión y las interrelaciones que se establecen entre el sistema nervioso y el músculo estriado (1, 20).

Las toxinas botulínicas ocasionan alteraciones funcionales a nivel del sistema nervioso y en particular en la unión neuromuscular. Esta unión, equivalente a la que se establece en las sinapsis inter-neuronales, resulta de la aproximación de dos membranas plasmáticas, una presináptica axonal, y una post-sináptica perteneciente a la célula muscular, separadas por un espacio denominado frente sináptico. La lámina basal, extracelular, interpuesta entre ambas membranas, se extiende a la lámina basal de la célula muscular acompañando a la membrana postsináptica. Por otra parte, un conjunto de especializaciones del sarcoplasma y de los núcleos de la célula muscular situados en la vecindad inmediata de la unión, confiere particularidades especiales a esta zona bien diferenciada de cada célula muscular. Es a nivel de esta especialización que está asegurada la transmisión del nervio al músculo y la síntesis de las proteínas que intervienen directa o indirectamente en los mecanismos de transmisión nerviosa. Gracias a las técnicas de purificación y de caracterización, numerosas proteínas presinápticas, post-sinápticas o ligadas a la lámina basal sináptica han sido identificadas en la unión neuromuscular, e incluso han podido ser localizadas ultraestructuralmente con métodos inmunocitoquímicos (1, 20).

Nuestros resultados muestran que los componentes que conforman la placa motora de las preparaciones neuromusculares estudiadas son afectados al ser tratados con



Figs. 7 y 8. Micrografía electrónica de sección transversa de terminales nerviosos del músculo LAL, 20 días posteriores a la inyección de toxina botulínica tipo A. Numerosos restos pertenecientes a procesos de células de Schwann (flecha) se observan en el entorno de terminales axónicos (asterisco) parcialmente fagocitados, con abundancia de fibras colágenas del tejido conectivo endomisial (cabeza de flecha). Bar: 0.65 μ m. Bar: 1.6 μ m.

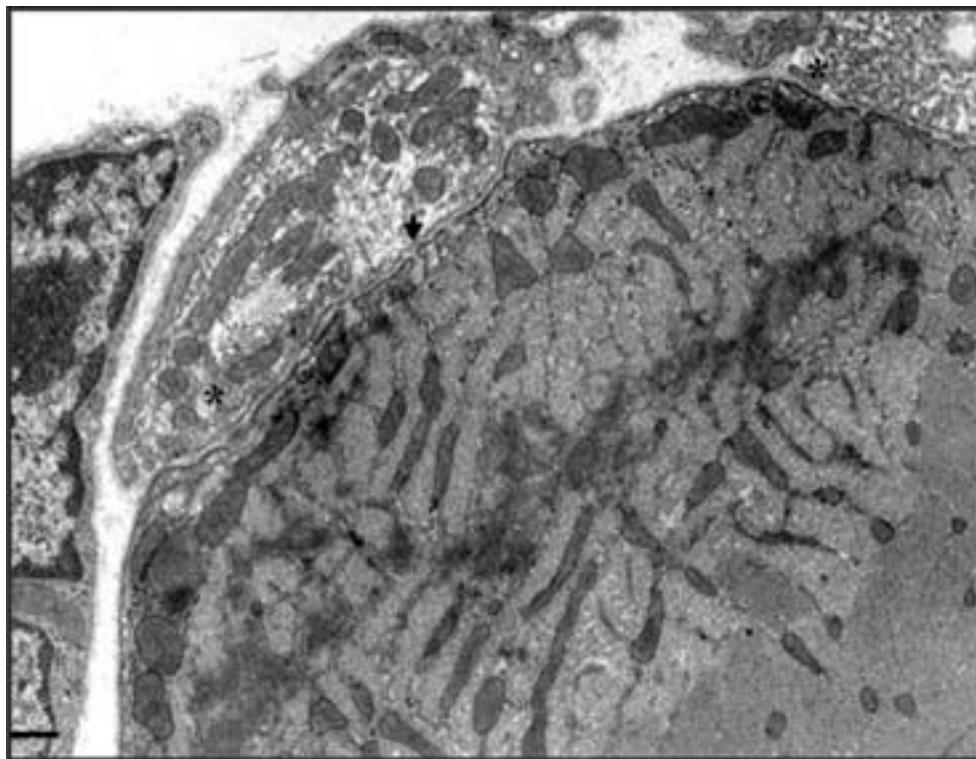


Fig. 9. Micrografía electrónica de sección transversa de terminales nerviosos del músculo LAL, 20 días posteriores a la inyección de toxina botulínica tipo A. Se observan terminales axónicos pequeños neoformados (asterisco) carentes de pliegues sinápticos visibles (flecha), parcialmente rodeados por restos de prolongaciones de células de Schwann (cuadrado). Bar: 0,95 μm .

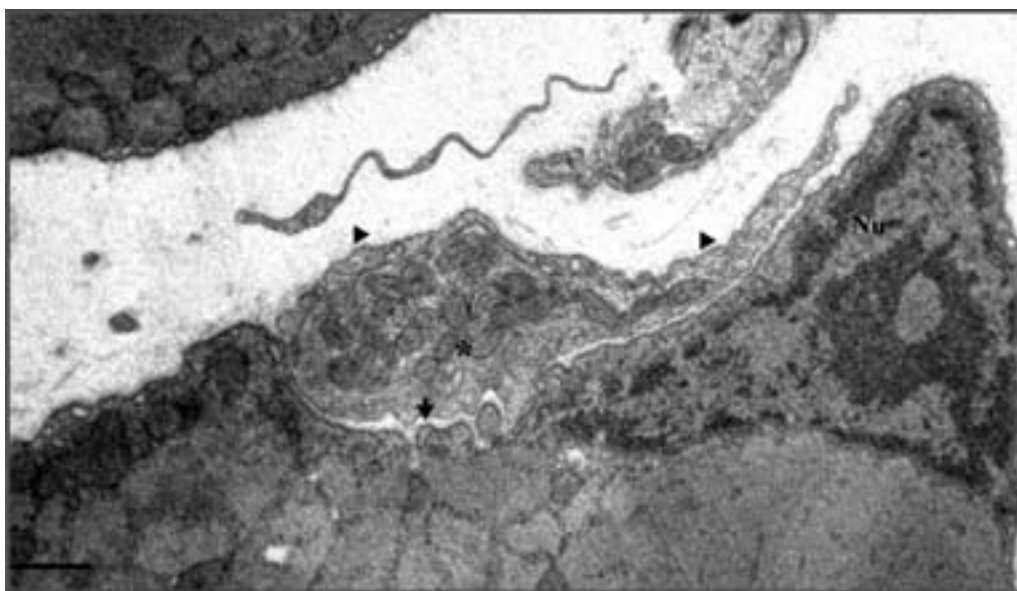


Fig. 10. Micrografía electrónica de sección transversa de terminales nerviosos del músculo LAL, 20 días posteriores a la inyección de toxina botulínica tipo A. Se observan terminales axónicos pequeños neoformados (asterisco) con pliegues sinápticos incipientes (flecha) en contacto con células musculares de núcleos irregulares y nucleolo prominente (Nu). Bar: 1.18 μm .

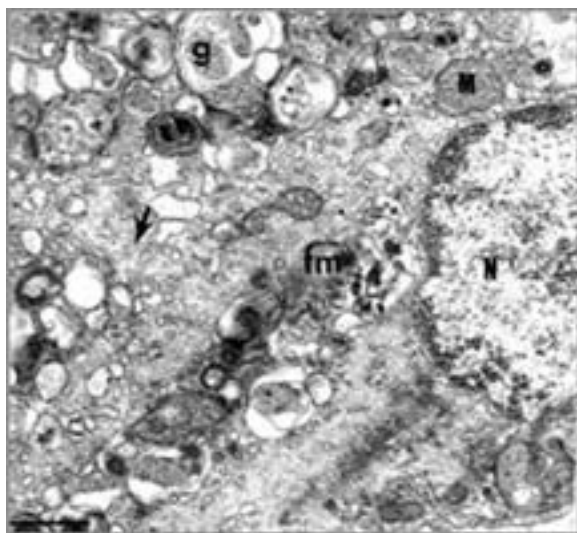


Fig. 11. Micrografía electrónica de sección transversa de célula muscular del LAL, 20 días posteriores a la inyección de toxina botulínica tipo A. Se muestra pérdida del patrón de la célula, quedando restos de organelos mitocondriales (m), algunas con tendencia a formar figuras mielínicas (fm), abundantes glucogenosomas (g), hinchamiento del retículo sarcoplásmico (fecha) y núcleos de apariencia normal (N). Bar: 2µm.

la toxina botulínica tipo A. La toxina inyectada localmente *in vivo* en la región donde se localiza el músculo LAL del ratón, provoca una parálisis generalizada del modelo experimental recuperándose gradualmente después de un período de dos semanas. La parálisis se produce al haber un bloqueo de la liberación cuántica de acetilcolina en el nervio motor afectado (26-30).

Los hallazgos ultraestructurales observados en el presente trabajo semejan a aquellos descritos en lesiones secundarias a una axotomía caracterizadas por la destrucción de los terminales nerviosos y por alteraciones de los componentes contráctiles y membranosos de la célula muscular. Estas lesiones son debidas a la pérdida de la influencia trófica del nervio motor sobre la célula muscular, al suscitarse eventos que impiden la generación del potencial de ac-

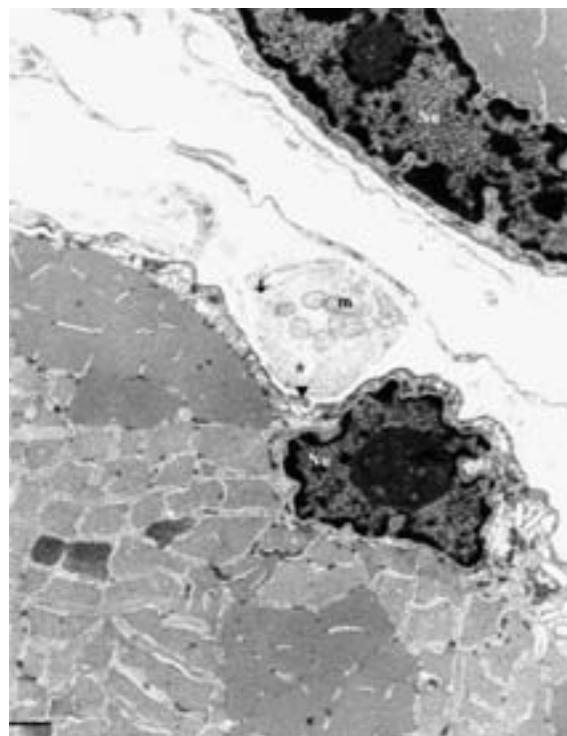


Fig. 12. Micrografía electrónica de sección transversa de células musculares del LAL, 20 días posteriores a la inyección de toxina botulínica tipo A. Los núcleos pertenecientes a las células musculares poseen contornos irregulares, abundante heterocromatina y nucleolos conspicuos (Nu). Se observa un terminal axónico pequeño (flecha) con población vesicular escasa (asterisco) y mitocondrias electrón transparente (m), carentes de pliegues sinápticos visibles (cabeza de flecha). Bar: 0.95 µm.

ción al bloquear la liberación de los neurotransmisores (31, 32). Las neurotoxinas botulínicas tipo A producidas por la bacteria *Clostridium botulinum* se unen a los terminales nerviosos periféricos, principalmente de tipo colinérgico, inhibiendo la liberación de acetilcolina al bloquear la transmisión nerviosa, provocando fenómenos transitorios similares a lo que ocurre al desnervar el músculo (31, 32). Las neurotoxinas han sido ampliamente utilizadas para entender los procesos propios de la degeneración y

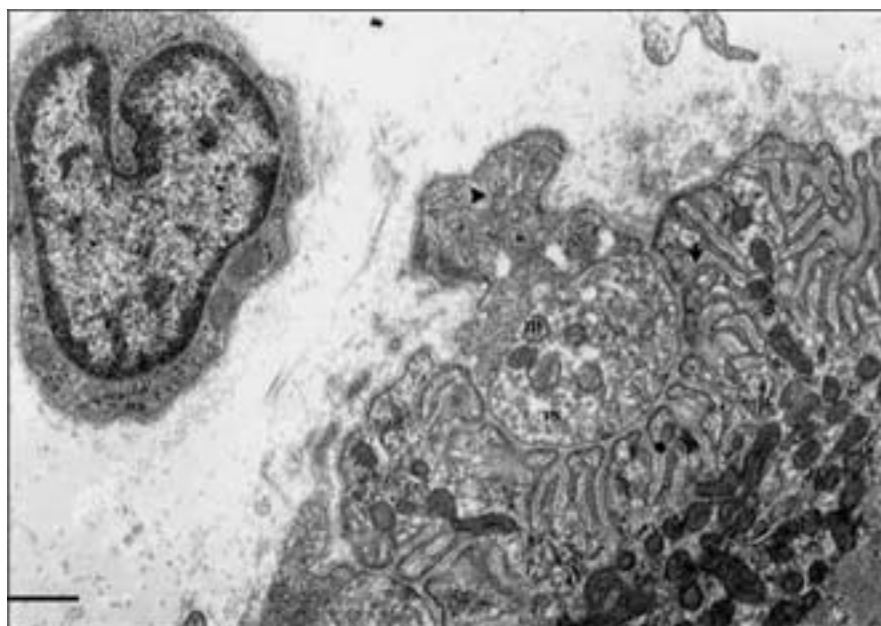


Fig. 13. Micrografía electrónica de sección transversa de terminales nerviosos del músculo LAL, 60 días posteriores a la inyección de toxina botulínica tipo A. Se observa prolongación de la célula de Schwann (cabeza de flecha) entornando al terminal axónico, caracterizado por presentar abundantes mitocondrias (m) y numerosas vesículas sinápticas (vs). Se evidencia abundantes pliegues en la región postsináptica (flecha). Bar: 0,9 μ m.

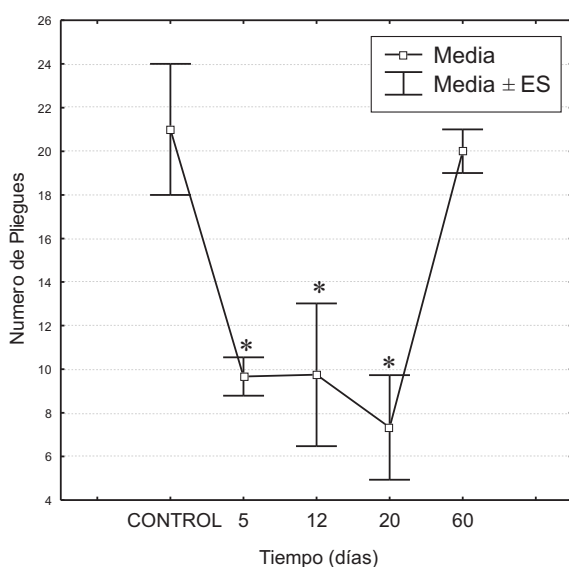


Fig. 14. Gráficas de Media y Errores estándar, que indican el valor promedio del perímetro de los pliegues sinápticos, a lo largo de los días y en comparación con el control, con un asterisco se indican los puntos que según análisis de la varianza son estadísticamente diferentes al control.

de la re-inervación de los componentes de la placa motora.

La actividad fisiológica neuronal se mantiene gracias al equilibrio dinámico existente entre los mecanismos de exo y endocitosis que regulan la población vesicular presente en el nervio terminal (19). El hallazgo de terminales axónicos desprovistos de su población vesicular habitual sugiere una afectación importante del reciclaje vesicular, lo cual se traduce en una reducción -transitoria- de la formación de las vesículas sinápticas; resultados que coinciden con los descritos para terminales nerviosos envenenados con toxinas aisladas de *Synanceia trachynis* (33). Por otra parte, evidenciamos que existe una correlación entre el número y el tipo de vesículas sinápticas presentes en los terminales nerviosos de la preparación neuromuscular utilizada, similar a lo observado en preparaciones de peces, anfibios y mamíferos (33-35).

La toxina botulínica tipo A, una vez que se internaliza en el terminal nervioso, afecta la población vesicular, ya que actúa sobre el mecanismo exocitótico de liberación cuántica de la acetilcolina e interactúa con las proteínas SNARE que participan en la fusión de las vesículas sinápticas en el frente sináptico. A diferencia de la toxina tetánica, la neurotoxina botulínica tipo A sólo afecta la exocitosis de las vesículas sinápticas, más no la endocitosis a nivel del nervio terminal (17-19, 21-24).

Una importante población de vesículas grandes de centro denso, con diámetros comprendidos entre 80-150 nm se observaron en los primeros cinco días posteriores a la administración de la toxina botulínica. Estas vesículas de centro denso poseen un elevado contenido de péptidos neurotransmisores (36), y se ha descrito que se disparan cuando se provoca una intensa estimulación nerviosa (35-37). Las vesículas de centro denso contienen sustancias activas que podrían estar involucradas en la diferenciación de la placa motora (38). La presencia de estructuras que semejan en su tamaño y apariencia a las vesículas de centro denso han sido descritas dentro de las hendiduras sinápticas, y la observación de dichas estructuras en el sarcoplasma de la célula muscular por debajo de la terminación nerviosa sugiere la posibilidad que los centros densos pudieran ser liberados y tomados en la unión neuromuscular por un proceso de exo y endocitosis (38).

Ultraestructuralmente y morfométricamente demostramos que la toxina botulínica tipo A origina placas motoras de apariencia inmadura caracterizadas por escasa complejidad y desarrollo de la hendidura sináptica primaria, al igual que en el número, tamaño y profundidad de sus pliegues sinápticos, resultados que coinciden con la descripción de pequeños brotes nerviosos terminales o nodales que participan activamente tanto en la remodelación sináptica

del LAL de mamíferos (39, 40) como en batracios (41, 42). Esta simplificación propia de los elementos mesurables de la placa motora pudiera relacionarse con los eventos descritos durante el desarrollo, regeneración (43) o degeneración de la unión neuromuscular (31, 32).

Al cabo de un período de tres semanas se evidenció una recuperación morfológica total de la sinapsis neuromuscular, que se caracterizó por la presencia de terminales axónicos con una población vesicular representativa, mitocondrias de aspecto normal y pliegues sinápticos desarrollados, con características morfométricas similares a los controles. Este reestablecimiento morfológico al parecer coincide con la recuperación funcional de la transmisión neuromuscular que conlleva a la normalización del patrón de actividad de la sinapsis que se lleva a cabo en forma más rápida en los músculos lentos que en los rápidos (44). Una vez que la neurotoxina botulínica es eliminada, las terminaciones originales recuperan su funcionalidad y simultáneamente comienza la retracción de las terminaciones neoformadas (20).

Las células de Schwann estrechamente asociadas a los terminales estudiados mostraron un gran desarrollo del RER, lo cual se traduce en una intensa síntesis proteica. Estas células son sensibles al daño por su estrecha relación interdependiente con los terminales nerviosos, y precisamente esta activación funcional podría ser un factor clave en la recuperación morfofuncional de la terminación nerviosa (45, 46). Al parecer las células de Schwann reciben señales mitogénicas de la neurona (47) y los terminales neoformados podrían estimular su división (48). Durante el período correspondiente al proceso de recuperación de los animales de experimentación, se observaron imágenes de terminales nerviosos completamente degenerados rodeados por restos de prolongaciones de células de Schwann. Estos hallazgos

apoyan la hipótesis de la actividad fagocítica desempeñada por las células de Schwann durante el proceso de degeneración y regeneración del terminal nervioso (49). Además, las células de Schwann experimentan un proceso de regulación autocrina por el factor de crecimiento fibroblástico 5, proteína descrita en macrófagos, células endoteliales y musculatura lisa de las paredes vasculares (50).

El hallazgo de gran cantidad de fibras colágenas en las inmediaciones de los terminales axónicos sugiere que los fibroblastos están relacionados con la secreción de diversos factores de crecimiento que contribuirían a la formación de pequeños axones carentes de pliegues de la membrana muscular. Además, los fibroblastos podrían sufrir un proceso de desdiferenciación hacia células de Schwann, evento que contribuiría con los fenómenos de remodelación morfológica y funcional anteriormente descritos (50).

Los cambios morfológicos que observamos en las células musculares están directamente relacionados con la degeneración de los terminales nerviosos, tal como se constató en la musculatura esquelética de ratones con deficiencia de tenascin-C (51). En todos los casos, la degeneración del terminal axónico precede la degeneración de la célula muscular que se manifiesta por pérdida de la organización del sistema contráctil, hinchamiento de los elementos del retículo sarcoplásmico, aparición de figuras mielínicas y en casos avanzados, atrofia marcada de la célula muscular (31).

El mecanismo de recuperación funcional del terminal nervioso se ha relacionado con las interrelaciones tróficas que se producen a nivel de la unión neuromuscular y que han sido evidenciadas con la aplicación específica de la toxina botulínica tipo A. Cuando se secciona el axón se destruyen los terminales nerviosos y se forman productos de degeneración del nervio terminal que se

sabe afectan la ultraestructura tanto de la célula muscular como del nervio terminal (52). La hipótesis de que el músculo paralizado secreta factores esenciales para el crecimiento y supervivencia de las motoneuronas pudiera estar relacionado con la presencia de células mioblásticas cercanas a los terminales afectados, hallazgos semejantes a los observados en otras afecciones neuromusculares de etiología diversa (53, 54).

Podemos concluir que la toxina botulínica tipo A provoca fenómenos de desnervación a nivel del nervio terminal y por ende, afecta los componentes de la placa motora. Las células de Schwann juegan un papel importante no sólo en la regeneración de los terminales nerviosos, sino también en la degradación de los mismos. La pérdida de la organización de la célula muscular se relaciona estrechamente con los cambios degenerativos observados en los terminales nerviosos. La persistencia de la atrofia de la célula muscular, la disminución de la liberación cuántica de acetilcolina y las fallas en la formación de nuevas placas motoras son probablemente efectos secundarios de la presencia de axones funcionalmente defectuosos. La adecuada interacción entre la célula de Schwann y el axón resulta fundamental para la maduración y la inducción de nuevas placas motoras (54).

AGRADECIMIENTO

Al TSU Edgar Mejía por su asistencia con el microscopio electrónico y el procesamiento de microfotografías.

Trabajo financiado por el CDCH-U.C.V. (Nº PI-09-12-5305-2003).

REFERENCIAS

1. **Couteaux R.** Particularités structurales de la jonction neuromusculaire. En: Christien Y, Nieoullon A, Rascol O., Ed. *Dystonie, neurone et plasticité* (Marseille): Solal 1999; Tomo II, No. 11-21.

2. **Thesleff S.** Botulinal neurotoxins as tools in studies of synaptic mechanisms. *Quart J Exp Physiol* 1989; 74: 1003-1017.
3. **Dolly JO, Barnard EA.** Nicotinic acetylcholine receptors: an overview. *Biochem Pharmacol* 1984; 33: 841-858.
4. **Meunier FA, Frangez R, Benoit E, Ouanounou G, Rouzaire-Dubois B, Suput D, Molgó J.** Ca^{2+} and Na^{+} contribute to the swelling of differentiated neuroblastoma cells induced by equinatoxin-II. *Toxicon* 2000; 38: 1547-1560.
5. **Benoit E, Juzans P, Legrand A, Molgó J.** Nodal swelling produced by ciguatoxin-induced selective activation of sodium channels in myelinated nerve fibers. *Neuroscience* 1996; 71: 1121-1131.
6. **Favreau P, Le Gall F, Molgó J.** Le venin de cones: source de nouveaux outils pour l'étude de récepteurs et canaux ioniques. *Ann Institut Pasteur* 1999; 10: 273-284.
7. **Le Gall F, Favreau P, Benoît E, Mattei C, Bouet F, Menou J, Menez A, Letourneux Y, Molgó J.** A new conotoxin isolated from *Conus consors* venom acting selectively on axons and motor nerve terminals through a Na^{+} -dependent mechanism. *Eur J Neurosci* 1999; 11: 3134-3142.
8. **Pulido-Mendez M, Rodríguez-Acosta A, Finol HJ, Aguilar I, Girón ME.** Ultrastructural pathology in skeletal muscle of mice envenomed with *Crotalus vegrandis* venom. *J Submicrosc Cytol Pathol* 1999; 31: 555-561.
9. **Rodríguez-Acosta A, Peña L, Finol H J, Pulido-Mendez M.** Cellular and subcellular changes in muscle, neuromuscular junctions and nerves caused by bee (*Apis mellifera*) venom. *J Submicrosc Cytol Pathol* 2004; 36: 91-96.
10. **D'Suze G, Salazar V, Díaz P, Sevcik C, Aspúrua H, Bracho N.** Histopathological changes and inflammatory response induced by *Tityus discrepans* scorpion venom in rams. *Toxicon* 2004; 44: 851-860.
11. **Holds JB, Alderson K, Fogg S, Anderson R.** Motor nerve sprouting in human orbicularis muscle after botulinum-A injection. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1990; 31: 964-967.
12. **Hambleton P.** Therapeutic application of botulinum toxin. *J Med Microbiol* 1993; 39: 243-245.
13. **Pauri F, Boffa L, Cassetta E, Pasqualetti P, Rossini PM.** Botulinum toxin type-A treatment in spastic paraparesis: a neurophysiological study. *J Neurol Science* 2000; 181: 89-97.
14. **Scott AB.** Botulinum toxin injection into extraocular muscles as an alternative to strabismus surgery. *Ophthalmology* 1980; 87: 1044-1049.
15. **Dolly JO, Aoki KR.** The structure and mode of action of different botulinum toxins. *Eur J Neurol* 2006; 13: 1-9.
16. **Meunier FA, Lisk G, Sesardic D, Dolly JO.** Dynamics of motor nerve terminal remodelling unveiled using SNARE-cleaving botulinum toxins: the extent and duration are dictated by the sites of SNAP-25 truncation. *Mol Cell Neurosci* 2003; 22: 454-466.
17. **Middlebrook JL.** Cellular mechanism of action of botulinum neurotoxin. *J Toxicol* 1986; 5: 177-190.
18. **Poulain B.** Mécanisme d'action moléculaire de la toxine tétanique et des neurotoxines botuliques. *Pathologie Biologie* 1994; 42: 173-182.
19. **Neale EA, Bowers LM, Jia M, Bateman KE, Williamson LC.** Botulinum neurotoxin A blocks synaptic vesicle exocytosis but not endocytosis at the nerve terminal. *J Cell Biol* 1999; 149: 1249-1260.
20. **Poulain B, Humeau Y.** Le mode d'action des neurotoxines botuliques: aspects pathologiques, cellulaires et moléculaires. *Ann Réadap Med Phys* 2003; 46: 265-275.
21. **Comella JX, Molgó J, Faille L.** Sprouting of mammalian motor nerve terminals induced by in vivo injection of botulinum type D toxin and the functional recovery of paralysed neuromuscular junctions. *Neurosci Lett* 1993; 153: 61-64.
22. **Duchen LW, Strich SJ.** The effects of botulinum toxin on the pattern of innervation of skeletal muscle in the mouse. *Quart J Exp Physiol* 1968; 53: 84-89.

23. **Angaut-Petit D, Molgó J, Comella JX, Faille L, Tabti N.** Terminal sprouting in mouse neuromuscular junctions poisoned with botulinum type A toxin: morphological and electrophysiological features. *Neuroscience* 1990; 37: 799-808.
24. **Juzans P, Comella J, Molgó J, Faille L, Angaut-Petit D.** Nerve terminal sprouting in botulinum type A treated mouse levator auris longus muscle. *Neuromuscular Disorder* 1995; 65(6): 177-185.
25. **Angaut-Petit D, Molgó J, Connold L, Faille L.** The levator auris longus muscle of the mouse: a convenient preparation for studies of short-and long-term presynaptic effects of drugs or toxins. *Neurosci Lett* 1987; 82:83-88.
26. **Molgó J, Comella JX, Angaut-Petit D, Pecot-Dechavassine M, Tabti N, Faille L, Mallart A, Thesleff S.** Presynaptic actions of botulinum neurotoxins at vertebrate neuromuscular junctions. *J Physiol (Paris)* 1990; 84:152-166.
27. **Poulain B, Molgó J, Thesleff S.** Quantal neurotransmitter release and the Clostridial neurotoxins' targets. *Curr Top Microbiol Immunol* 1995; 192: 243-252.
28. **Molgó J, Meunier FA, Sellin L.** Quantal transmitter release at botulinum-treated vertebrate neuromuscular junction. *Neurochemistry* 1997; 26:713-717.
29. **Dolly JO, Halliwell J V, Black JD, Williams RS, Pelchen-Matthews A, Breeze A L, Mehraban F, Othman B, Black AR.** Botulinum neurotoxin and dendrotoxin as probes for studies on transmitter release. *J Physiol (Paris)* 1984; 79:280-303.
30. **Sellin LC.** The pharmacological mechanism of botulism. *TIPS* 1985; 80-83.
31. **Miledi R, Slater C.** Electron-microscopic structure of denervated skeletal muscle. *Proc. Roy. Soc Lond* 1996; 174: 253-269.
32. **Lu DX, Huang SK, Carlson BM.** Electron microscopic study of long-term denervated rat skeletal muscle. *Anat Rec* 1997 248(3): 355-365
33. **Colasante C, Meunier F, Kreger A, Molgó J.** Selective depletion of clear synaptic vesicles and enhanced quantal transmitter release at frog motor nerve endings produced by trachynilysin, a protein toxin isolated from stonefish (*Synanceia trachynis*). *Eur J Neuroscience* 1996; 8:2149-2156.
34. **Matteoli M, Haiman C, Torri-Tarelli F, Polar J M, Ceccarelli B.** Differential effects of α -latrotoxin on exocytosis from small synaptic vesicles and from large vesicles containing calcitonin gene-related peptide at the frog neuromuscular junction. *Proc Natl Acad Sci* 1990; 85:7366-7370.
35. **Pecot-Dechavassine M, Brouard MO.** Large dense-core vesicles at the frog neuromuscular junction: characteristics and exocytosis. *J Neuroscience* 1997; 26: 455-465.
36. **Matteoli M, Haiman C, De Camilli P.** Substance P-like immunoreactivity at the frog neuromuscular junction. *Neuroscience* 1990; 37: 271-275.
37. **De Camilli P, Jahn R.** Pathways to regulated exocytosis in neurons. *Annu. Rev Physiol* 1990; 52: 625-645.
38. **Smith AD.** Summing up: some implications of the neuron as a secreting cell. *Phil Trans Roy. Soc. Lond. B* 1971; 261: 423-437.
39. **Goldeberger M, Murray M.** Patterns of sprouting and implications for recovery of function. *Adv Neurol* 1988; 47: 361-384.
40. **Pascal J, Comella J, Molgó J, Faille L, Angaut-Petit D.** Nerve terminal sprouting in botulinum type-treated A mouse levator auris longus. *Neuromuscle Disord* 1996; 6:177-185.
41. **Ring G, Reichert F, Rotschenker S.** Sprouting in intact sartorius of the frog following contralateral axotomy. *Brain Res* 1983; 260: 313-316.
42. **Díaz J, Molgó J, Dechavassine M.** Sprouting of frog motor nerve terminals after long-term paralysis by botulinum type A toxin. *Neurosci Lett* 1989; 96: 127-132.
43. **Lentz T.** Development of the neuromuscular junction. *J Cell Biol* 1969; 42(2): 143-443
44. **Duchen LW.** Changes in motor innervations and cholinesterase localization induced by botulinum toxin in skeletal muscle of the mouse: differences be-

- tween fast and slow muscles. *J Neurol Neurosurg Physchiat* 1970; 33: 44-54.
45. **Balice-Gordon RJ.** Schwann Cells: dynamic roles at the neuromuscular junction. *Curr Biol* 1996; 6: 1054-1056.
 46. **Son Y, Thompson W.** Schwann cell processes guide regeneration of peripheral axons. *Neuron* 1995; 14: 125-132.
 47. **Salzer JL, Bunge RP, Glaser L.** Studies of Schwann cell proliferation –III. Evidence for the surface localization of the neurite mitogen 1980; *J Cell Biol* 84:767-778.
 48. **Gomez S, Duchen LW, Hornsey S.** Effects of X-irradiation on axonal sprouting induced by botulinum toxin. 1982, *Neuroscience* 7: 1023-1036.
 49. **Pullian DL, April EW.** Degenerative changes at the neuromuscular junctions of red and intermediate muscle fibers. Response to short stump nerve section. *J. Neurol Sci.* 1979; 43:205-222.
 50. **McGeachie AB, Koishi K, Imamura T, McLennan IS.** Fibroblast growth factor-5 is expressed in Schwann cells and is not essential for motoneurone survival. *Neuroscience* 2001; 104:891-899.
 51. **Cifuentes-Diaz C, Meunier FA, Velasco ME, Rieger F, Molgó J.** Morphological alteration of motor nerve terminals after botulinum type-A poisoning or reinnervation of skeletal muscle in the tenascin-C deficient mouse. Xth International Symposium on Cholinergic mechanisms. 1998; 22:421-422.
 52. **Miledi R, Slater CR.** On the degeneration of rat neuromuscular junctions after nerve section. *J Physiol* 1970; 207(2):507-528.
 53. **Sewry CA.** Ultrastructural changes in diseased muscle. En: Dubowitz, V, editor. *Muscle biopsy. A practical approach.* London: Bailliere Tindall, 1985; p 129-183.
 54. **Thesleff S, Molgó J, Tågerud S.** Trophic interrelations at the neuromuscular junction as revealed by the use of botulinum neurotoxins. *J Physiol (Paris)* 1990; 84(2): 167-173.