



Biomédica

ISSN: 0120-4157

biomedica@ins.gov.co

Instituto Nacional de Salud

Colombia

Cerón, Jeimmy; Troncoso, Julieta
Alteraciones de las células de la microglía del sistema nervioso central provocadas por
lesiones del nervio facial
Biomédica, vol. 36, núm. 4, 2016, pp. 619-631
Instituto Nacional de Salud
Bogotá, Colombia

Disponible en: <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=84348515016>

- Cómo citar el artículo
- Número completo
- Más información del artículo
- Página de la revista en redalyc.org

redalyc.org

Sistema de Información Científica
Red de Revistas Científicas de América Latina, el Caribe, España y Portugal
Proyecto académico sin fines de lucro, desarrollado bajo la iniciativa de acceso abierto

ARTÍCULO ORIGINAL

Alteraciones de las células de la microglía del sistema nervioso central provocadas por lesiones del nervio facial

Jeimmy Cerón¹, Julieta Troncoso^{1,2}

¹ Laboratorio de Neurofisiología Comportamental, Departamento de Ciencias Fisiológicas, Facultad de Medicina, Universidad Nacional de Colombia, Bogotá, D.C., Colombia

² Departamento de Biología, Facultad de Ciencias, Universidad Nacional de Colombia, Bogotá, D.C., Colombia

Introducción. El grupo de investigación del Laboratorio de Neurofisiología Comportamental de la Universidad Nacional de Colombia ha descrito modificaciones estructurales y electrofisiológicas en neuronas piramidales de la corteza motora producidas por la lesión del nervio facial contralateral en ratas. Sin embargo, poco se sabe sobre la posibilidad de que dichos cambios neuronales se acompañen también de modificaciones en las células gliales circundantes.

Objetivo. Caracterizar el efecto de la lesión unilateral del nervio facial sobre la activación y proliferación de las células de la microglía en la corteza motora primaria contralateral en ratas.

Materiales y métodos. Se hicieron pruebas de inmunohistoquímica para detectar las células de la microglía en el tejido cerebral de ratas sometidas a lesión del nervio facial, las cuales se sacrificaron en distintos momentos después de la intervención. Se infligieron dos tipos de lesiones: reversible (por compresión, lo cual permite la recuperación de la función) e irreversible (por corte, lo cual provoca parálisis permanente). Los tejidos cerebrales de los animales sin lesión (grupo de control absoluto) y de aquellos sometidos a falsa cirugía se compararon con los de los animales lesionados sacrificados 1, 2, 7, 21 y 35 días después de la lesión.

Resultados. Las células de la microglía en la corteza motora de los animales lesionados irreversiblemente mostraron signos de proliferación y activación entre el tercero y séptimo días después de la lesión. La proliferación de las células de la microglía en animales con lesión reversible fue significativa solo a los tres días de infligida la lesión.

Conclusiones. La lesión del nervio facial produce modificaciones en las células de la microglía de la corteza motora primaria. Estas modificaciones podrían estar involucradas en los cambios morfológicos y electrofisiológicos descritos en las neuronas piramidales de la corteza motora que comandan los movimientos faciales.

Palabras clave: microglía; células piramidales; corteza motora; rata.

doi: <http://dx.doi.org/10.7705/biomedica.v36i4.3259>

Facial nerve injuries cause changes in central nervous system microglial cells.

Introduction: Our research group has described both morphological and electrophysiological changes in motor cortex pyramidal neurons associated with contralateral facial nerve injury in rats. However, little is known about those neural changes, which occur together with changes in surrounding glial cells.

Objective: To characterize the effect of the unilateral facial nerve injury on microglial proliferation and activation in the primary motor cortex.

Materials and methods: We performed immunohistochemical experiments in order to detect microglial cells in brain tissue of rats with unilateral facial nerve lesion sacrificed at different times after the injury. We caused two types of lesions: reversible (by crushing, which allows functional recovery), and irreversible (by section, which produces permanent paralysis). We compared the brain tissues of control animals (without surgical intervention) and sham-operated animals with animals with lesions sacrificed at 1, 3, 7, 21 or 35 days after the injury.

Results: In primary motor cortex, the microglial cells of irreversibly injured animals showed proliferation and activation between three and seven days post-lesion. The proliferation of microglial cells in reversibly injured animals was significant only three days after the lesion.

Contribución de los autores:

Jeimmy Cerón: pruebas de inmunohistoquímica, cortes en crióstato del tejido cerebral, procesamiento de las imágenes de los tejidos para análisis y conteo celular

Julieta Troncoso: cirugías de lesión del nervio facial, pruebas de inmunohistoquímica, captura de fotografías del tejido cerebral, análisis de resultados y redacción del manuscrito.

Conclusions: Facial nerve injury causes changes in microglial cells in the primary motor cortex. These modifications could be involved in the generation of morphological and electrophysiological changes previously described in the pyramidal neurons of primary motor cortex that command facial movements.

Key words: Microglial; pyramidal cells; motor cortex; rat.

doi: <http://dx.doi.org/10.7705/biomedica.v36i4.3259>

En algunos roedores el movimiento activo de las vibrisas posibilita la exploración táctil del entorno inmediato de manera muy precisa y les permite construir una representación dinámica de los objetos a su alrededor (1-3). Cuando los animales baten activamente sus vibrisas, lo hacen por la contracción alternada de los músculos intrínsecos y extrínsecos del parche de vibrisas, lo cual permite que estas se muevan en el plano horizontal hacia adelante y hacia atrás de manera coordinada, rítmica y a una gran velocidad (4,5).

Los músculos asociados a los movimientos de las vibrisas son controlados por motoneuronas cuyos somas se ubican en el núcleo facial, las cuales, a su vez, están comandadas por múltiples estructuras premotoras (6). En la corteza cerebral, las células piramidales de la capa V de la corteza motora agranular medial, o corteza motora primaria de las vibrisas (*Vibrissal Motor Cortex*, vM1), actúan mediante proyecciones monosinápticas directas sobre las motoneuronas del núcleo del nervio facial que comandan el movimiento de las vibrisas (neuronas córtico-faciales) (7). Tanto el tálamo somatosensorial como la corteza somatosensorial primaria, envían proyecciones a la corteza vM1, de modo que esto permite ajustar el patrón de movimientos con base en la información sensorial recibida (8).

La axotomía del nervio facial en roedores se ha utilizado ampliamente para el estudio de la plasticidad del sistema sensitivo y motor de las vibrisas, no solo en las motoneuronas dañadas y las células gliales circundantes en el núcleo del nervio facial, sino también para lo relacionado con los cambios en otras estructuras cerebrales (9). Se sabe que después de las lesiones de nervio periférico, las motoneuronas cuyos axones han sido lesionados sufren cambios que incluyen la retracción de su árbol dendrítico (10,11), la modificación de

sus propiedades electrofisiológicas (tanto activas como pasivas) (12-14) y cambios en los niveles de expresión de determinados genes (15-18).

El Laboratorio de Neurofisiología Comportamental de la Universidad Nacional de Colombia se ha enfocado en evaluar los cambios que se producen en las neuronas piramidales de la vM1 después de la axotomía del nervio facial. En tal sentido, se ha encontrado que estas neuronas corticales que se proyectan directamente sobre las motoneuronas lesionadas sufren una retracción del árbol dendrítico (19,20) y una disminución de las espinas dendríticas apicales y basales, después de la lesión irreversible del nervio facial (20). Más aún, se ha descrito que las propiedades electrofisiológicas de las neuronas de la vM1 cambian cuando se produce la lesión del nervio facial: hay una modificación en la frecuencia basal de disparo, en la probabilidad de disparo como reacción a estímulos sensoriales y en el ritmo de estas neuronas después de la lesión (21). En reportes previos a este trabajo se describe, además, que en la corteza motora hay activación de los astrocitos y un aumento de la expresión de la proteína conexina 43 después de la lesión del nervio facial (22), y una reorganización de los mapas corticales motores después de la axotomía (23).

Por otra parte, se sabe que, tras lesiones del sistema nervioso central, el árbol dendrítico de las neuronas sometidas a axotomía y de las 'denervadas' se remodela y se registra un aumento en la expresión de las quimiocinas, las cuales activan las células de la microglía residentes; se ha planteado que dicha activación es necesaria para que ocurra la remodelación neuronal después de una lesión (24,25). Es por esto que las células de la microglía se consideran los sensores más sensibles de alteraciones en el sistema nervioso central. En cerebros sanos, las células de la microglía residentes poseen largas y finas prolongaciones móviles con las cuales exploran y hacen el reconocimiento de su entorno (microglía en reposo o residente) (26). Ante una lesión central, un proceso inflamatorio o cualquier otro evento que perturbe la homeostasis cerebral, las células de la microglía se activan, es decir, sufren

Correspondencia:

Julietta Troncoso, Departamento de Biología, Facultad de Ciencias, Universidad Nacional de Colombia, Ciudad Universitaria, Carrera 30 N° 45-02, Edificio 421, Oficina 225, Bogotá, D.C., Colombia
Teléfono: (571) 316 5000, extensión 11331
jtroncoso@unal.edu.co

Recibido: 03/03/16; aceptado: 05/05/16

un proceso de transformación que les confiere la capacidad de liberar una gran cantidad de sustancias que pueden actuar en beneficio o detrimento de las células a su alrededor. En este estado activo, las células de la microglía pueden proliferar y migrar hacia el sitio de la lesión, cumpliendo uno de sus principales roles: actuar como células capaces de fagocitar desechos celulares, así como de promover la secreción de sustancias que permiten la supervivencia neuronal (27).

Poco se sabe, sin embargo, sobre la activación de las células de la microglía en la corteza motora después de lesiones periféricas. Nuestro grupo de investigación publicó recientemente datos que sugieren que las células de la microglía proliferan en la corteza motora después de la lesión del nervio facial. Efectivamente, se ha registrado un aumento significativo de las células de la microglía cercanas a las neuronas piramidales de la vM1 después de la lesión irreversible del nervio facial en ratones transgénicos que expresaban proteína verde fluorescente en las células de la microglía (20). A pesar de este dato preliminar, no se conocía la dinámica de la proliferación de las células de la microglía y su posible activación como reacción a la lesión del nervio facial en ratas. Tampoco se conocían las posibles diferencias en el comportamiento de las células de la microglía en la corteza cerebral después de una lesión reversible del nervio facial, en comparación con las lesiones permanentes, es decir, irreversibles.

En este contexto, el objetivo del presente estudio fue conocer la dinámica de la activación de las células de la microglía que rodean las neuronas piramidales de proyección córtico-facial después de lesiones reversibles o irreversibles del nervio facial.

Materiales y métodos

Sujetos

Se utilizaron 40 machos adultos de ratas albinas (*Rattus norvegicus*) de la cepa Wistar, de 290 ± 30 g de peso, provenientes del Bioterio del Instituto Nacional de Salud en Bogotá. Los animales se mantuvieron en grupos de cuatro por caja en un salón con humedad ($40 \pm 5\%$) y temperatura ($20 \pm 3^\circ\text{C}$) controladas, sometidos a ciclos de 12 horas de luz y oscuridad (las luces se encendían a las 7:00 am). Los animales tuvieron acceso *ad libitum* a agua y comida, y permanecieron al menos cuatro días en el laboratorio antes de cualquier procedimiento experimental para que se habituaran a las nuevas condiciones de alojamiento.

Diseño experimental

Los animales se dividieron en cinco grandes grupos experimentales: de control absoluto ($n=4$), de control positivo ($n=2$), sometidos a falsa cirugía ($n=4$), con lesión reversible ($n=15$) y con lesión irreversible ($n=15$) del nervio facial. Los animales lesionados de forma reversible e irreversible se dividieron, a su vez, en cinco subgrupos de tres ejemplares cada uno según el día de sacrificio (1, 3, 7, 21 o 35 días después de la lesión). Los animales se asignaron al azar a cada uno de los 13 grupos experimentales. El esquema del diseño experimental se presenta en la figura 1A.

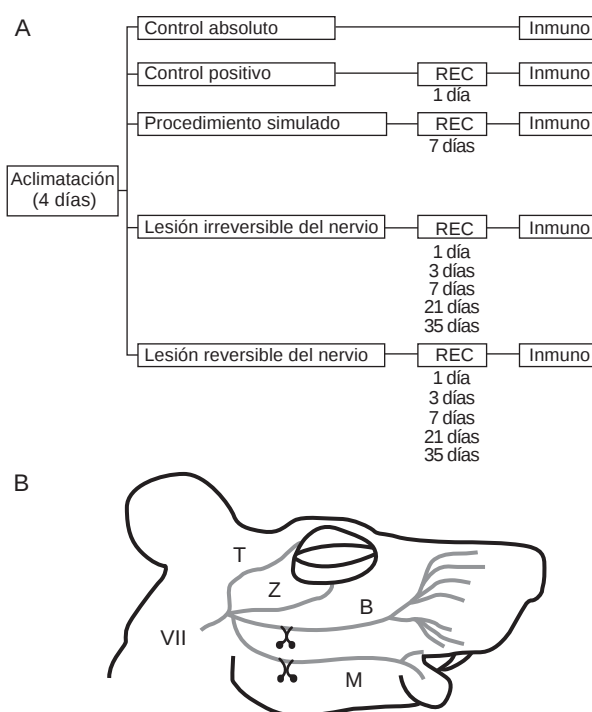


Figura 1. A. Esquema del diseño experimental. Control absoluto: animales sin ningún tipo de intervención quirúrgica; control positivo: animales con lesión cortical; falsa cirugía: animales sometidos a falso procedimiento de lesión del nervio facial; lesión irreversible: lesión por corte de las ramas bucal y mandibular del nervio facial; lesión reversible: lesión por compresión de las ramas bucal y mandibular del nervio facial. REC: tiempo de recuperación después de la intervención quirúrgica; inmuno: procesamiento del tejido cerebral para estudios de inmunohistoquímica con el anticuerpo Iba-1 para la detección de microglías. **B.** Lesión del nervio facial. En la lesión irreversible se corta y se retira aproximadamente 1 mm de las ramas mandibular y bucal del nervio facial. En la lesión reversible se comprimen las dos ramas con una pinza mosquito durante 30 segundos en una dirección y durante otros 30 segundos en posición perpendicular a la primera. VII: séptimo par craneal (nervio facial). T: rama temporal; Z: rama zigomática (en este experimento quedaron intactas).

Procedimiento experimental

Grupo de control absoluto (C): animales que no habían sido sometidos a ningún procedimiento quirúrgico antes del procesamiento de su tejido cerebral para los estudios inmunohistoquímicos.

Grupo de control positivo: animales sometidos a lesión cerebral para corroborar positivamente la activación de las células de la microglía. Los animales se colocaron en un marco estereotáxico bajo anestesia general con ketamina (100 mg/kg) y xilazina (10 mg/kg) administradas por vía intraperitoneal y en condiciones asépticas. Después de afeitar la cabeza del animal, se expuso el cráneo mediante una incisión fronto-occipital para remover la piel. Se removió el periostio de una pequeña porción que comprendiera la corteza motora de las vibrisas del lado derecho (vM1, coordenadas en el eje antero-posterior (AP): +1,5; lateral (L): 0,5), y se procedió a perforar el cráneo con una broca de 1 mm de diámetro. Una vez en la superficie del cerebro, se deslizó perpendicularmente una aguja de 0,5 mm de calibre hasta una profundidad de 0,5 cm, aproximadamente. Por último, la piel se suturó con puntos discontinuos utilizando seda 4-0.

Grupo de animales sometidos a falsa cirugía: animales sometidos al procedimiento con falsa cirugía simulando lesión del nervio facial. Bajo anestesia general con ketamina (100 mg/kg) y xilazina (10 mg/kg) administradas por vía intraperitoneal y en condiciones asépticas, se afeitó la región periauricular del lado derecho del animal colocado en decúbito lateral. A través de una incisión horizontal de 2 cm por encima del ángulo mandibular se disecaron las ramas bucal y mandibular del nervio facial manteniendo intacta su integridad. La incisión en la piel se suturó con puntos discontinuos utilizando seda 4-0.

Grupo de animales sometidos a cirugía de lesión reversible del nervio facial: animales con posibilidad de recuperación de la función motora. Bajo anestesia general con ketamina (100 mg/kg) y xilazina (10 mg/kg) administradas por vía intraperitoneal y en condiciones asépticas, se afeitó la región periauricular del lado derecho del animal colocado en decúbito lateral. A través de una incisión horizontal de 2 cm por encima del ángulo mandibular, se disecaron las ramas bucal y mandibular del nervio facial, y se procedió a la lesión por compresión de cada una de las ramas (figura 1B). La lesión se hizo presionando cada rama mediante pinzas mosquito durante 30

segundos en una dirección y otros 30 segundos en dirección perpendicular a la primera compresión. La efectividad de la lesión se confirmó por estimulación eléctrica de las regiones proximales y distales de cada rama lesionada; se la consideró satisfactoria si el animal movía las vibrisas con la estimulación eléctrica distal, pero no con la estimulación eléctrica proximal de cada una de las ramas. Los bordes de piel se suturaron con puntos discontinuos utilizando seda 4-0.

Grupo de animales sometidos a cirugía de lesión irreversible del nervio facial: animales con parálisis facial permanente. Bajo anestesia general con ketamina (100 mg/kg) y xilazina (10 mg/kg) administradas por vía intraperitoneal y en condiciones asépticas, se afeitó la región periauricular del lado derecho del animal colocado en decúbito lateral. A través de una incisión horizontal de 2 cm por encima del ángulo mandibular, se disecaron las ramas bucal y mandibular del nervio facial y se procedió a hacer un corte y retirar 1 mm de cada una de las ramas del nervio facial (figura 1B). La efectividad de la lesión se confirmó mediante estimulación eléctrica de las regiones proximales y distales de cada rama lesionada. La lesión se consideró satisfactoria si el animal movía las vibrisas con la estimulación eléctrica distal, pero no con la estimulación eléctrica proximal de cada una de las ramas. Los bordes de piel se suturaron con puntos discontinuos utilizando seda 4-0.

Evaluación de la actividad motora

Los movimientos de las vibrisas se monitorizaron diariamente mediante una cámara de video manual a partir del día siguiente del procedimiento quirúrgico, tanto en los animales sometidos a falsa cirugía como en aquellos lesionados reversible o irreversiblemente. Cada animal se filmó durante dos minutos diariamente mientras se le permitía explorar libremente con sus vibrisas algún objeto novedoso que el experimentador le presentaba. Esto se hizo hasta el séptimo día después de la lesión con los animales del grupo sometido al procedimiento simulado, momento en el que se sacrificaron para hacer los estudios de inmunohistoquímica. En el caso de los animales con lesión del nervio facial, su sacrificio se hizo en los días 1, 3, 7, 21 o 35 de la lesión.

Inmunohistoquímica

Perfusión. A cada animal se lo sometió a sedación profunda mediante la administración intraperitoneal de uretano en una dosis de 1,6 g/kg. Se abrió la cavidad torácica para exponer el corazón y se

insertó una cánula en el ventrículo izquierdo, con el fin de retirar por completo la sangre del animal mediante perfusión intracardiaca con 40 a 50 ml de solución salina al 0,9 %, y fijar el tejido cerebral con 80 a 100 ml de una solución de paraformaldehído al 4 % preparada en solución tampón PBS (*Phosphate-Buffered Saline*) 0,1 M (pH 7,4).

Corte con crióstato. Al finalizar la perfusión intracardiaca, el cerebro de cada animal se almacenó en la solución fijadora. Posteriormente, los cerebros se transfirieron a una solución de sacarosa al 30 % durante 72 horas aproximadamente, para su protección en frío. Finalizado este período, los cerebros se congelaron en isopentano en hielo seco (-70 °C) y se almacenaron en un congelador a -70 °C, hasta el momento de su sección. Se obtuvieron secciones coronales de 50 µm de grosor con un crióstato a una temperatura de -20 °C. De cada animal se recolectaron y almacenaron secciones elegidas para visualizar la corteza motora primaria (eje AP: +3,70 a -0,26) (27).

Anticuerpos anti-Iba-1

Para la detección de las células de la microglía se utilizó como marcador la proteína Iba1 (*Ionized calcium binding adaptor molecule 1*), la cual se expresa de forma específica en macrófagos y células de la microglía, y es regulada positivamente ante la activación de dichas células.

La inmunorreacción de la proteína Iba1 se detectó empleando el antisuero policlonal producido en conejo anti-Iba1 (Wako, Cat. #019-19741). La unión de antígeno y anticuerpo se reveló mediante la técnica de avidina, biotina, peroxidasa, con el kit ABC de Vectastain (Laboratorios Vector, USA, Ref. PK 6101). Para retirar el anticongelante las secciones de tejido se lavaron inicialmente dos veces durante diez minutos en solución tampón PBS 0,1 M (pH 7,4). Posteriormente, se bloqueó la peroxidasa endógena incubando los tejidos en peróxido de hidrógeno (H₂O₂) al 1 % durante veinte minutos; se hicieron cuatro lavados adicionales con PBS 0,1 M antes de iniciar el bloqueo de los sitios de unión inespecíficos con suero fetal bovino (SFB al 10 %. ABM. Ref. TM999) y gelatina de piel de bovino (GPB al 10 %. Sigma-Aldrich. Ref. G6650-100G) durante una hora a temperatura ambiente y en agitación.

A continuación, las secciones se incubaron toda la noche con el anticuerpo primario (anti-Iba1, dilución 1:1000 en la solución de bloqueo) a temperatura ambiente y en agitación. Al finalizar la incubación con el anticuerpo primario, se hicieron cuatro

lavados de cinco minutos en PBS 0,1 M, y se inició la incubación con el anticuerpo secundario biotinilado anti-conejo producido en cabra (Laboratorios Vector, USA, Ref. PK 6101; 1:250, PB-Tritón, SFB al 3 %, GPB al 10 %), durante dos horas en agitación a temperatura ambiente. Después de cuatro lavados de cinco minutos en PBS 0,1 M, las secciones se incubaron con solución de avidina-biotina durante dos horas, se lavaron nuevamente con PBS 0,1 M, y se inició el proceso de revelado empleando una solución de 3,3'-diaminobenzidina (DAB al 0,05 %, Laboratorios Vector, USA, Ref. SK-4100); la reacción se detuvo retirando la solución de DAB y añadiendo PBS 0,1 M. Por último, las secciones de tejido se montaron en láminas histológicas para ser fotografiadas posteriormente.

Análisis de datos

El análisis de las células de la microglía se hizo sobre las láminas de histología con un microscopio de luz, según la guía del atlas de coordenadas estereotáxicas de Paxinos, *et al.* (28). Las células positivas para Iba-1 en la corteza vM1 se cuantificaron en las fotomicrografías tomadas con un aumento de 400X (10X ocular más 40X objetivo). El número de células se expresó por campo fotografiado de 280 x 230 µm. Para la estimación del área ocupada por las células de la microglía, las fotomicrografías se procesaron con el programa Image J, el cual permite calcular el área ocupada por las células de la microglía en contraste con el fondo.

Pruebas estadísticas

Los datos del análisis del conteo de las células de la microglía, así como del área total, se sometieron a pruebas estadísticas de ANOVA de una vía para establecer diferencias significativas entre los grupos. Se utilizó un valor crítico de significación de $p < 0,05$. Para las comparaciones pareadas entre los grupos de control absoluto y de falsa cirugía, se utilizó la prueba t de Student, con un valor crítico de significación de $p < 0,05$.

Consideraciones éticas

Todos los procedimientos experimentales, así como las condiciones de alojamiento y la disposición de los residuos biológicos y químicos, se ajustaron a la normativa dispuesta en la Ley 84 del 27 de diciembre de 1989. También se observaron los procedimientos para el manejo y cuidado de animales de laboratorio recomendados por la Unión Europea (8616091EU) y por los *National Institutes of Health (NIH Guide for the Use and Care of Laboratory Animals)* de los Estados Unidos.

Todos los experimentos se diseñaron y se efectuaron de tal manera que se ocasionara el menor sufrimiento posible a los animales, y en su diseño se garantizó la utilización de la menor cantidad de ejemplares.

Los experimentos recibieron la aprobación de los Comités de Ética de las Facultades de Ciencias (Acta 01 05/2011) y de Medicina (Acta 05/2011) de la Universidad Nacional de Colombia.

Resultados

Modificaciones de la actividad motora

Los movimientos de las vibrisas de los animales se filmaron durante cinco semanas mediante una sesión diaria, a partir del día después de la lesión de las ramas mandibular y bucal del nervio facial derecho. Se estableció que, una semana después de la lesión por compresión unilateral del nervio facial (lesión reversible), los animales recuperaron la tonicidad de los músculos intrínsecos de las vibrisas del lado lesionado; dos semanas después de la lesión, recuperaron la movilidad, aunque sus movimientos no eran sincrónicos con respecto al lado no lesionado, y cuatro semanas después, los animales recuperaron las características normales de batido de las vibrisas del lado lesionado (arco de movimiento, velocidad, sincronización), en comparación con el lado contralateral no lesionado (figura 2A).

Por otro lado, los animales sometidos a lesión por corte del nervio facial (lesión irreversible) no recuperaron nunca la función motora perdida, es decir, sufrieron una parálisis permanente de las vibrisas (por lo menos durante las cinco semanas registradas). Los animales con lesión irreversible mostraron, además, desviación de la nariz hacia el lado no lesionado, retracción de sus vibrisas inmóviles durante las dos primeras semanas después de la lesión y recuperación parcial de la tonicidad a partir de la tercera semana (figura 2B), tal como se había descrito en experimentos anteriores (19,20). Por último, los animales sometidos a falsa cirugía, al igual que los animales con lesión cerebral (grupo de control positivo), mostraron un batido de vibrisas indistinguible de aquellos no intervenidos del grupo de controles.

Corroboración de la activación de las células de la microglía

Se sabe que las células de la microglía se activan con diversos estímulos y que una microglía activada se distingue de una residente por su morfología y

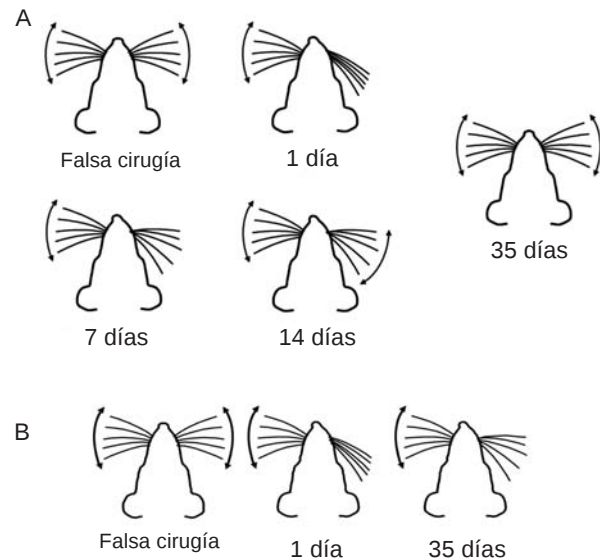


Figura 2. Modificación de la función motora tras la lesión del nervio facial. **A.** Lesión reversible del nervio facial. Los animales con intervención simulada movían las vibrisas de manera rítmica y sincronizada, tal como los animales de control absoluto. Un día después de la lesión reversible de las ramas mandibular y bucal del nervio facial, los animales presentaban parálisis facial evidenciada por la ausencia de los movimientos característicos de las vibrisas. A los siete días de la lesión (7 días), los animales recuperaron la tonicidad muscular. A las dos semanas de la lesión (14 días), se detectaron movimientos de las vibrisas del lado lesionado aunque sin sincronización con respecto al lado contralateral. A las cinco semanas de la lesión (35 días), la recuperación funcional era completa. **B.** Lesión irreversible del nervio facial. Después del corte de las ramas mandibular y bucal del nervio facial, los animales no recobraron el movimiento, a pesar de haber recuperado la tonicidad a partir de la primera semana de la lesión.

capacidad antigénica. Una forma de asegurarse de que las células de la microglía residentes en el sistema nervioso central se activen consiste en provocar un daño directo en el tejido cerebral.

Tal como se esperaba, los tejidos de los animales con lesión cerebral (controles positivos) mostraron claros patrones de activación de las células de la microglía, con cambios morfológicos como reacción al daño cortical (figura 3A). Las células de la microglía se mostraron abundantes y con prolongaciones celulares gruesas y cortas (figura 3A, izquierda). En una fotografía con mayor ampliación, se pudo observar la morfología alterada de estas células de la microglía después de la lesión cerebral (figura 3A). También, se encontraron abundantes células redondeadas con inmunorreacción positiva frente a Iba-1 en el sitio de la lesión (figura 3A), células redondeadas que podrían ser monocitos infiltrados en el tejido desde el sistema circulatorio.

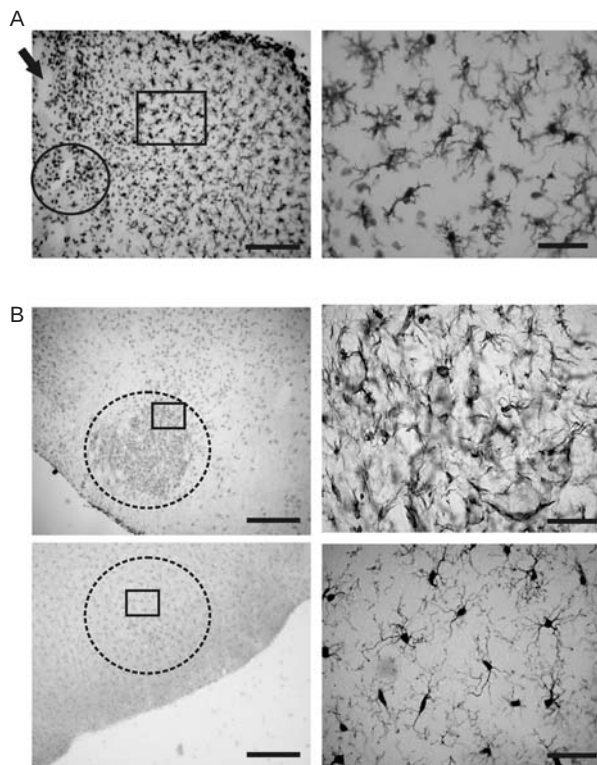


Figura 3. A. Inmunorreacción frente a Iba 1 en animales del grupo de control positivo (lesión cortical directa). Izquierda: fotografía representativa de la corteza motora primaria (vM1) en la que se aprecia la lesión cortical (flecha), la infiltración de monocitos en el tejido (círculo) y la activación de las microglías (rectángulo) producto de la lesión directa en el sistema nervioso central. Las fotografías se tomaron un día después de la lesión cortical. Barra de calibración: 200 μ m. Derecha: ampliación del recuadro de la fotografía de la izquierda. Barra de calibración: 50 μ m. **B.** Inmunorreacción frente a Iba 1 de los núcleos faciales de animales sometidos a lesión irreversible del nervio facial derecho. Arriba, izquierda: fotografía representativa del núcleo facial derecho en la que se observa una clara activación de las microglías en todo el núcleo del nervio facial (círculo punteado), es decir, en torno a los cuerpos celulares de las motoneuronas lesionadas; derecha: ampliación del recuadro de la fotografía de la izquierda. Abajo, izquierda: fotografía del núcleo del nervio facial izquierdo en el que se observan las microglías residentes sin activación; derecha: ampliación del recuadro de la fotografía de la izquierda. Barras de calibración, izquierda: 400 μ m; derecha: 50 μ m. Las fotografías se tomaron una semana después de la lesión del nervio facial derecho.

Modificación de las células de la microglía del núcleo del nervio facial tras la axotomía

La axotomía del nervio facial es un sistema experimental ampliamente utilizado para detectar la activación de las células de la microglía en el núcleo de dicho nervio (9). En este modelo experimental, los macrófagos no pueden invadir el núcleo del nervio facial desde el torrente sanguíneo ya que, tratándose de una lesión periférica, no hay

una ruptura de la barrera hematoencefálica. Para corroborar esto, se examinaron los cambios en la expresión de Iba-1 en el núcleo del nervio facial de los animales sometidos a lesiones irreversibles del nervio, una semana después de la intervención.

Como puede verse con poca ampliación en la figura 3B (fotografía con poca ampliación), hubo un incremento en la inmunorreacción frente a Iba-1 circunscrito al núcleo del nervio facial del lado lesionado. A medida que se utilizó un mayor aumento, se pudieron distinguir células muy teñidas, correspondientes a las células de la microglía activadas que rodean las motoneuronas cuyo axón había sido dañado (figura 3B). Se pudo observar, además, que la forma de estas células se había alterado y presentaban grandes somas y prolongaciones cortas y gruesas.

Expresión de Iba-1 en animales sin lesión del grupo de control

La inmunorreacción de la proteína Iba1 en la vM1 en los grupos de control absoluto y de intervención simulada, se presenta en fotografías representativas de animales de ambos grupos en la figura 4. Como se puede apreciar, tanto en los animales del

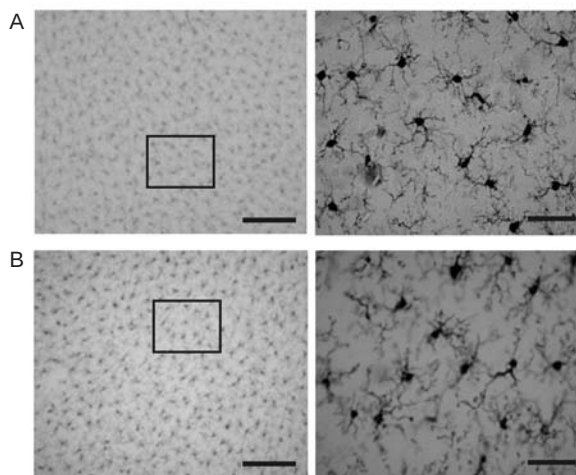


Figura 4. Inmunorreacción frente a Iba 1 en la corteza motora primaria de las vibrissas (vM1) de los animales de control. **A.** Control absoluto (sin intervención quirúrgica). Izquierda: la fotografía representativa de la vM1 muestra microglías con largas prolongaciones y somas pequeños, correspondientes al fenotipo de microglía residente sin activación; derecha: ampliación de la fotografía de la izquierda. **B.** Falsa cirugía. Izquierda: al igual que el grupo de control absoluto, las microglías en la vM1 presentan una morfología característica de células residentes sin activación; derecha: ampliación de la fotografía de la izquierda. Las fotografías se tomaron una semana después de la falsa cirugía. Nótese que no hay diferencia entre las microglías de ninguno de los grupos. Barra de calibración para A y B: izquierda: 200 μ m, derecha: 50 μ m.

grupo de control absoluto como en los sometidos a falsa cirugía, las células de la microglía presentaban una morfología similar, típica de su estado de reposo (residente), caracterizado por un cuerpo celular pequeño acompañado de prolongaciones largas y ramificadas. Tampoco se presentaron diferencias entre los grupos en cuanto al patrón de distribución celular ni en el número de células por campo ($t_{(6)}=1,16$; $p=0,29$), o en el área ocupada por las mismas ($t_{(6)}=0,89$; $p=0,41$).

Activación de las células de la microglía en la corteza motora primaria de las vibrisas después de la lesión irreversible del nervio facial

En la figura 5A se puede apreciar una secuencia fotográfica del patrón de activación de las células de la microglía en la corteza motora primaria de las vibrisas, después de la lesión irreversible del nervio facial en animales sacrificados en distintos momentos después de la intervención. En general, la determinación del estado de activación de las células de la microglía se basa en sus características morfológicas; en estado activo, estas células presentan, no solo proliferación, sino también alteraciones morfológicas caracterizadas principalmente por el engrosamiento y la retracción de sus ramificaciones, así como por cuerpos celulares agrandados. Este patrón es semejante al encontrado en el presente estudio tras la lesión cortical (figura 3).

La activación de las células de la microglía en la vM1 se inició de forma rápida tras la lesión del nervio facial, y fue evidente desde el día siguiente de producirse, con un pico máximo a los tres días de la lesión, punto en el cual las células presentaban una morfología con prolongaciones más gruesas en comparación con las registradas en cualquiera de los otros intervalos de tiempo analizados (figura 5B). La activación de las células de la microglía se redujo, aunque continuó siendo evidente, una semana después de la lesión. Tres semanas después de esta, las células de la microglía recuperaron su morfología en estado basal o de reposo, y se evidenciaron características morfológicas y patrones de distribución similares a los observados en la corteza motora de los animales sometidos a falsa cirugía; estas características se seguían observando cinco semanas después de la lesión. Vale la pena destacar que la reducción en la activación de las células de la microglía tres y cinco semanas después de la lesión ocurrió sin que se recuperara el movimiento de las vibrisas del lado lesionado, pues la parálisis era irreversible.

Cuantificación de las modificaciones de las células de la microglía en la corteza motora primaria de las vibrisas después de la lesión irreversible

El análisis de varianza reveló diferencias significativas entre los grupos en la densidad de células de la microglía contabilizadas en la vM1 ($F_{(5, 17)}=62,94$; $p<0,001$). Específicamente, las comparaciones mediante el método de Holm-Sidak mostraron un incremento significativo en la densidad de las células de la microglía en los grupos de animales sacrificados a los tres y los siete días de la lesión ($p<0,001$), en comparación con el grupo sometido a falsa cirugía. Por otra parte, en los grupos de animales sacrificados a los 21 y a los 35 días de la lesión, este aumento se revirtió, ya que no se presentaron diferencias significativas en la densidad de las células de la microglía con respecto al grupo sometido a falsa cirugía (figura 5C).

De igual forma, el análisis de varianza para comparar el área ocupada por las células de la microglía en las vM1, empleada como un indicador de activación después de la lesión, mostró diferencias significativas entre los grupos ($F_{(5, 17)}=11,54$; $p<0,001$). Específicamente, las comparaciones mostraron que a los tres días de la lesión hubo un aumento significativo de las células de la microglía activadas en la vM1, en comparación con el grupo de falsa cirugía (figura 5C).

Activación de las células de la microglía en la corteza motora primaria de las vibrisas después de la lesión reversible del nervio facial

En la figura 6A se muestra la secuencia fotográfica correspondiente al patrón de activación de las células de la microglía en la vM1 en animales sacrificados en distintos momentos después de la compresión de las ramas bucal y mandibular del nervio facial derecho. El análisis de las fotografías del procedimiento de inmunohistoquímica reveló que hubo proliferación de las células de la microglía en la vM1 tras la lesión reversible del nervio facial. Se observaron alteraciones morfológicas caracterizadas principalmente por engrosamiento y retracción de sus ramificaciones, así como un aumento en la cantidad de células por campo, tal como ocurrió en el caso de la lesión irreversible. Sin embargo, con la lesión reversible estos cambios fueron menos notorios y más transitorios.

Como se muestra en la figura 6A, la activación de las células de la microglía en la vM1 se inició rápidamente tras la lesión reversible del nervio facial, y se hizo más evidente a los tres días de la

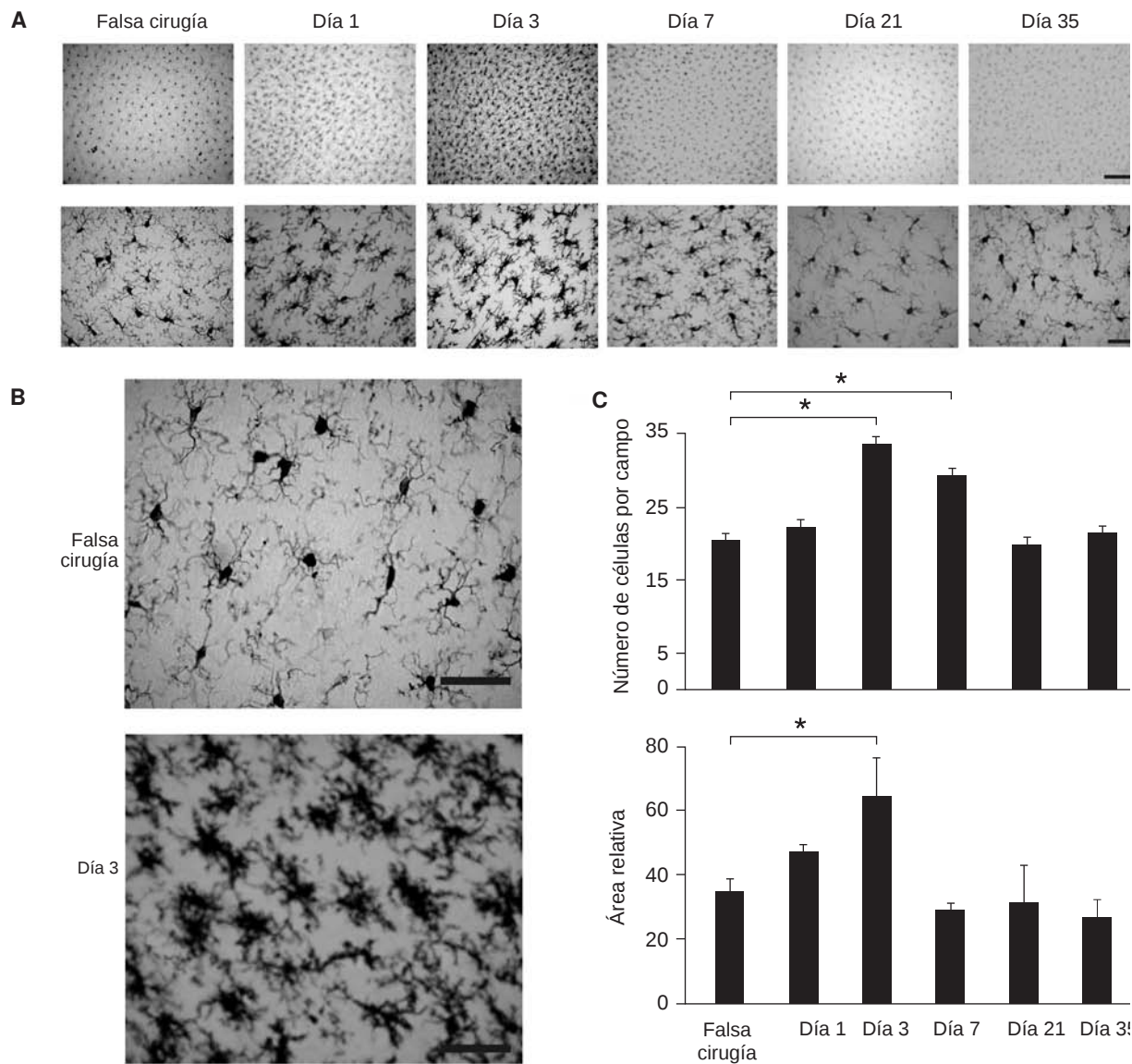


Figura 5. A. Evolución de los cambios en las microglías en la corteza motora primaria de las vibrisas (vM1) después de la lesión unilateral irreversible del nervio facial. Se muestran fotografías representativas de la evolución de los cambios en las microglías resultado de los cortes coronales de la vM1 en los animales sacrificados en distintos momentos después de la lesión irreversible del nervio facial, comparados con el grupo de control sometido a la intervención simulada: animales sacrificados 1, 3, 7, 21 y 35 días después de la lesión irreversible del nervio facial derecho. Barras de calibración, arriba: 200 μ m; abajo: 50 μ m. **B.** Expresión de las microglías a los tres días de la lesión. Se muestra una ampliación de fotografías correspondientes a los grupos de falsa cirugía a los tres días de la lesión, en la cual pueden apreciarse mejor los cambios morfológicos y la proliferación de microglías asociada a la lesión irreversible a los tres días de la lesión comparados con el grupo de falsa cirugía. **C.** Cuantificación de las modificaciones en las microglías en la corteza motora primaria de las vibrisas (vM1). Arriba: número de microglías en cortes de vM1 de animales sometidos a lesión del nervio facial comparados con los sometidos a falsa cirugía; abajo: área relativa ocupada por las microglías en cortes de vM1 de animales sometidos a lesión del nervio facial comparados con los sometidos a falsa cirugía. *: $p < 0,01$

lesión. Al igual que con la lesión irreversible, a los tres días de la lesión reversible las células de la microglía exhibían prolongaciones más gruesas en comparación con las observadas en cualquiera de los otros intervalos de tiempo analizados (figura 6B). A los tres días de la lesión reversible, la activación

de las células de la microglía se redujo. A partir de los siete días de la lesión retornaron al grado basal de activación, y se evidenciaron características morfológicas y patrones de distribución similares a los observados en la corteza motora de los animales sometidos a falsa cirugía.

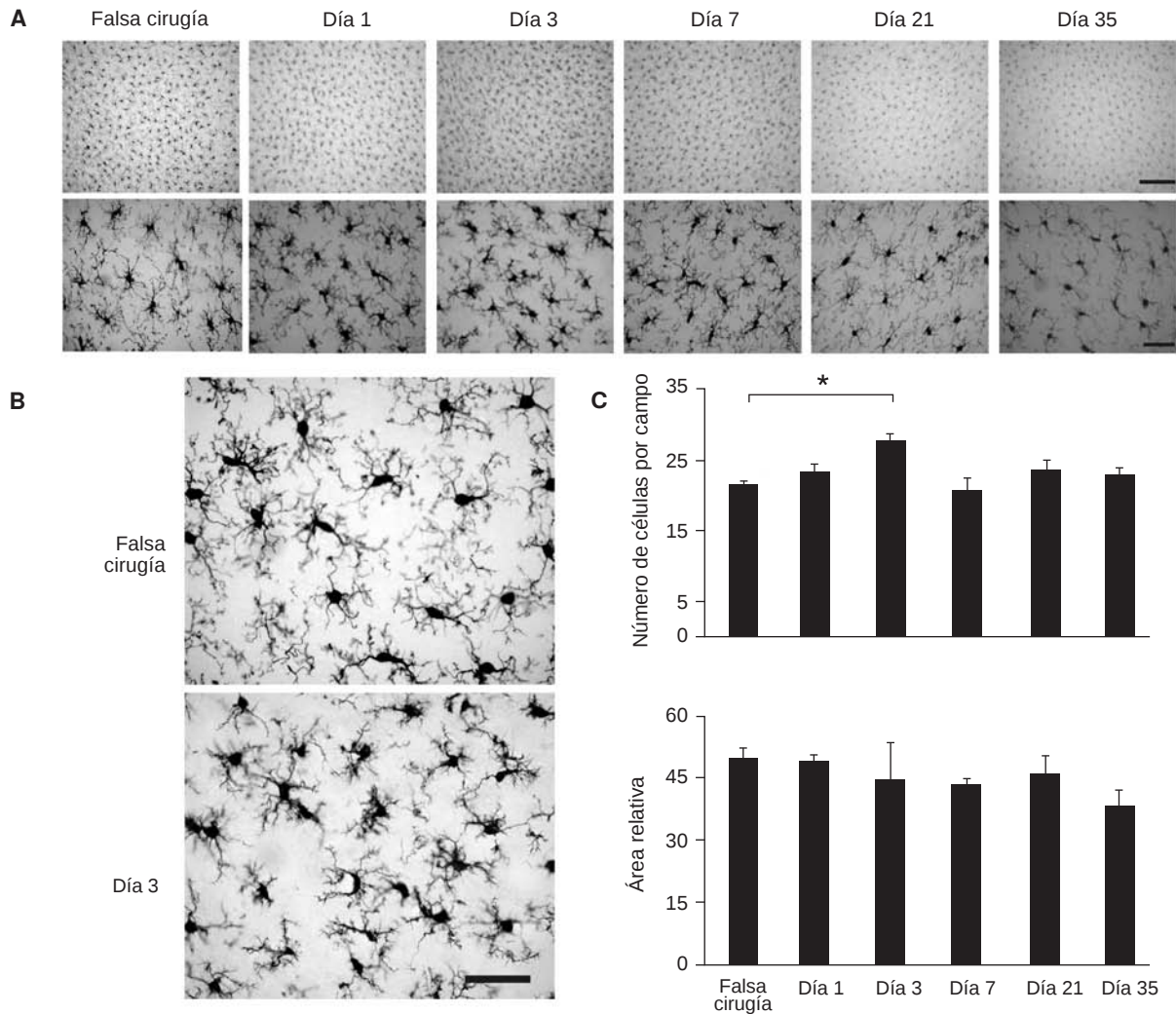


Figura 6. A. Evolución de los cambios de las microglías en la corteza motora primaria de las vibrisas (vM1) después de la lesión unilateral reversible del nervio facial. Se muestran fotografías representativas de la evolución de los cambios en las microglías de animales sacrificados en diferentes momentos después de la lesión comparados con los del grupo de falsa cirugía en cortes coronales de la vM1: animales sacrificados 1, 3, 7, 21 y 35 días después de la lesión. Barras de calibración: arriba: 200 μ m; abajo: 50 μ m. **B.** Expresión de las microglías tres días después de la lesión. Se muestra una ampliación de fotografías correspondientes a los grupos sometidos a falsa cirugía y los sacrificados al tercer día, en la cual puede apreciarse mejor la proliferación de microglías asociada a la lesión reversible a los tres días de la lesión en el grupo sometido a intervención simulada. **C.** Cuantificación de las modificaciones en las microglías en la vM1. Arriba: número de microglías en cortes de la vM1 de animales sometidos a lesión del nervio facial comparados con los sometidos a falsa cirugía; abajo: área relativa ocupada por las microglías en cortes de la vM1 de animales sometidos a lesión del nervio facial comparados con los sometidos a falsa cirugía. *: $p < 0,01$

En este caso, la reducción de la activación de las células de la microglía precedió la recuperación funcional: si bien los animales comenzaron a mover nuevamente las vibrisas a partir de la segunda semana de la lesión (dado que se trataba de una lesión reversible con recuperación de la función, figura 2), las células de la microglía volvieron a su estado de reposo a partir de los siete días de la lesión, es decir, cuando la recuperación de la función aún no se había evidenciado.

Cuantificación de las modificaciones de las células de la microglía en la corteza motora primaria de las vibrisas después de la lesión reversible

El análisis de varianza reveló diferencias significativas entre los grupos en la densidad de células de la microglía contabilizadas en la vM1 ($F_{(5,17)}=30,5$; $p < 0,001$). Específicamente, las comparaciones con el método de Holm-Sidak mostraron un incremento significativo en la densidad de las células de la

microglía en los grupos de animales sacrificados a los tres días de la lesión ($p < 0,001$), comparados con el grupo de control sometido a falsa cirugía. Por otra parte, en los grupos de animales sacrificados a los 7, 21 y 35 días de la lesión, dicho aumento se revirtió, ya que no se presentaron diferencias significativas en la densidad de las células de la microglía comparada con la del grupo de falsa cirugía (figura 6C).

Por el contrario, el análisis de varianza para comparar el área ocupada por las células de la microglía (indicador de activación) en la vM1 después de la lesión reversible, no mostró diferencias significativas entre los grupos ($F_{(5,17)} = 50,2$; $p = 0,6$) (figura 6C).

Discusión

Una de las estructuras de máximo interés para nuestro grupo de investigación es la corteza motora primaria y, además, los cambios que se producen en ella después de una lesión del nervio facial. En el 2005, Ginevich, *et al.*, demostraron (7) que en los roedores existe una conexión monosináptica directa entre la corteza motora primaria y el núcleo del nervio facial (proyección córtico-facial motora o vM1) (7). De este modo, y sabiendo que las motoneuronas lesionadas se modifican estructural y funcionalmente después de daños en sus axones (9), cabe esperar que también ocurran modificaciones en las células que se proyectan sobre ellas. De hecho, se han descrito modificaciones de los mapas corticales motores (23), y cambios morfológicos (19,20) y electrofisiológicos (21) en las células piramidales de la vM1 asociados a una lesión del nervio facial. En el presente estudio, el propósito de la investigación fue evaluar los cambios en las células de las células de la microglía que circundan las neuronas piramidales de la vM1 después de una lesión del nervio facial.

Los resultados obtenidos evidenciaron que en los primeros días después de la lesión del nervio facial, se produjo una reacción controlada en la vM1 consistente en la proliferación y la alteración morfológica de las células de la microglía. Estos cambios parecen preceder las alteraciones ya descritas en las neuronas de la corteza motora primaria, por lo que es necesario estudiar si existe alguna relación entre ambos fenómenos y, de haberla, determinar los mecanismos involucrados.

Resulta relevante que el patrón observado de alteración de las células de la microglía varió considerablemente entre los animales sometidos a

lesión irreversible del nervio facial y los sometidos a lesión reversible. En general, la proliferación de las microglías tras la lesión irreversible fue más marcada y duradera que en el caso de la lesión por compresión del nervio facial. De igual manera, al usar como indicador de actividad el área ocupada por las microglías tras la lesión, se puede inferir que la activación de aquellas que circundan las células piramidales en la vM1 ocurre, significativamente, cuando la lesión del nervio facial es más grave, es decir, cuando hay corte del nervio y no hay posibilidad de recuperación de la función motora.

Se ha establecido que una de las características fundamentales de las microglías es su rápida activación como reacción a cambios patológicos en el sistema nervioso central, tales como inflamación, isquemia, trauma, tumores o procesos neurodegenerativos (27). En este trabajo se corroboró este hecho tanto en los animales con lesiones corticales directas (grupo de control positivo), como en aquellos con lesiones irreversibles del nervio facial. En estos casos, las microglías actuarían como células fagocíticas, promoviendo la remoción de desechos, y como promotoras de la reparación neuronal (29). De hecho, se ha establecido claramente que una herida penetrante en el sistema nervioso central, que cause un daño directo en los vasos sanguíneos con ruptura de la barrera hematoencefálica y destrucción neuronal aguda, produce la diferenciación de las microglías en un fenotipo activado que expresa moléculas antigénicas de superficie, y que libera factores de crecimiento que facilitarían la supervivencia y la regeneración axonal (30).

Probablemente, esto fue lo que sucedió en los animales del grupo de control positivo en este estudio. Se ha demostrado, asimismo, que ante lesiones del nervio facial, las microglías sufren modificaciones morfológicas y, además, proliferan y migran al entorno de los cuerpos de las motoneuronas cuyos axones han sido sometidos a corte (29), lo cual se observó en este trabajo. Sin embargo, lo que cabe preguntarse es por qué las microglías también proliferan y se activan en la corteza motora ante un daño en el sistema nervioso periférico (nervio facial), en el que la barrera hematoencefálica queda intacta.

Las microglías en estado de reposo mantienen una vigilancia dinámica sobre las sinapsis de las neuronas circundantes, generando interacciones debidas al movimiento de sus prolongaciones

largas y finas. Se ha observado que estas interacciones estructurales dependen de la actividad sináptica de la neurona (31). De esta manera, los cambios en las microglías asociados a una lesión del nervio facial podrían corresponder a modificaciones sinápticas de la corteza motora tras la lesión, lo cual es coherente con los cambios en la actividad electrofisiológica de las células piramidales de la vM1 que se proyectan sobre las motoneuronas lesionadas, tal como se describió recientemente en otro trabajo de nuestro grupo de investigación (19). Estas modificaciones sinápticas se producirían porque la lesión del nervio facial provoca una parálisis de las vibrisas que altera la llegada de información sensorial al sistema nervioso central: al no poder mover activamente sus vibrisas, los animales reciben la información sensorial a través de sus bigotes solo de forma pasiva. Esto, a su vez, modificaría las sinapsis córtico-corticales entre los sistemas sensorial y motor. Es probable, entonces, que las microglías detecten esos cambios, y reaccionen proliferando y activándose transitoriamente ante la retirada de entradas sinápticas sensoriales a la corteza motora, especialmente cuando la lesión del nervio facial es irreversible.

Por otra parte, también se pudo establecer que las células piramidales de la vM1 sufren modificaciones morfológicas tras la lesión del nervio facial, incluidas la retracción de su árbol dendrítico y la poda espinal (20,21). Estas modificaciones también podrían relacionarse con la presencia de microglías activadas muy tempranamente en la corteza motora tras la lesión. De hecho, se sabe que es necesario el reclutamiento y la proliferación de las microglías para que se produzcan alteraciones dendríticas neuronales después de una lesión (24).

La versatilidad que presentan las microglías para detectar los cambios resultantes de lesiones periféricas o centrales, del compromiso inmunológico o de situaciones de estrés, se debe, en gran parte, a la expresión de una variada gama de receptores para distintas sustancias. Por ejemplo, en cultivos celulares de microglías se ha reportado la expresión de receptores adrenérgicos, receptores de glutamato (ionotrópicos y metabotrópicos), receptores GABA, receptores de dopamina, receptores de bradicinina y cierto tipos de receptores purinérgicos, así como receptores para una gran cantidad de citocinas (27). Hace falta establecer, entonces, si las células piramidales de vM1 realmente reclutan a las microglías mediante algún tipo de señal soluble que actúa

sobre receptores en este tipo de células y promueve su reclutamiento, proliferación y activación después de una lesión. Es interesante destacar que estas posibles señales parecen ejercer un efecto mayor cuanto más grave sea la lesión del nervio facial (lesión irreversible), en comparación con las lesiones transitorias reversibles, casos en los que solo se pudo apreciar un aumento transitorio de la proliferación de microglías, pero no su activación.

Es importante continuar explorando las posibles implicaciones funcionales de las diferencias en los patrones de activación de las microglías observados en este estudio. El propósito en trabajos futuros es explorar las funciones específicas de las microglías en el sistema nervioso central tras una lesión del nervio facial y la forma en que dichas funciones pueden variar dependiendo de si el daño en el nervio es o no es reversible.

Conflicto de intereses

Los autores manifiestan que no tienen conflictos de intereses con relación a la publicación de este artículo.

Financiación

Este trabajo contó con el apoyo financiero de la Fundación para la Promoción de la Investigación y la Tecnología, FPIT-450 (Código de Proyecto: 3380).

Referencias

1. **Brecht M, Preilowsky B, Merzenich M.** Functional architecture of the mystacial vibrissae. *Behav Brain Res.* 1997;84: 81-97. [http://dx.doi.org/10.1016/S0166-4328\(97\)83328-1](http://dx.doi.org/10.1016/S0166-4328(97)83328-1)
2. **Carvell G, Simmons D.** Biometric analyses of vibrissae tactile discrimination in the rat. *J Neurosci.* 1990;10:2638-48.
3. **Mehta SB, Kleinfeld D.** Frisking the whiskers: Patterned sensory input in the rat vibrissa system. *Neuron.* 2004;41: 181-4. [http://dx.doi.org/10.1016/S0896-6273\(04\)00002-9](http://dx.doi.org/10.1016/S0896-6273(04)00002-9)
4. **Carvell GE, Simons DJ, Lichtenstein SH, Bryant P.** Electromyographic activity of mystacial pad musculature during whisking behavior in the rat. *Somatosens Mot Res.* 1991;8:159-64.
5. **Berg RW, Kleinfeld D.** Vibrissa movement elicited by rhythmic electrical microstimulation to motor cortex in the aroused rat mimics exploratory whisking. *J Neurophysiol.* 2003;90:2950-63. <http://dx.doi.org/10.1152/jn.00511.2003>
6. **Hattox AM, Priest CA, Keller A.** Functional circuitry involved in the regulation of whisker movements. *J Comp Neurol.* 2002;442:266-76. <http://dx.doi.org/10.1002/cne.10089>
7. **Grinevich V, Brecht M, Osten P.** Monosynaptic pathway from rat vibrissa motor cortex to facial motor neurons revealed by lentivirus-based axonal tracing. *J. Neurosci.* 2005;25:8250-8. <http://dx.doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2235-05.2005>

8. **Izraeli R, Porter LL.** Vibrissal motor cortex in the rat: Connections with the barrel field. *Exp Brain Res.* 1995;104: 41-54. <http://dx.doi.org/10.1007/BF00229854>
9. **Moran LB, Graeber MB.** The facial nerve axotomy model. *Brain Res Brain Res Rev.* 2004;44:154-78. <http://dx.doi.org/10.1016/j.brainresrev.2003.11.004>
10. **Brännström T, Kellerth JO.** Recovery of synapses in axotomized adult cat spinal motoneurons after reinnervation into muscle. *Exp Brain Res.* 1999;125:19-27. <http://dx.doi.org/10.1007/s002210050653>
11. **Peyghambari F, Valojerdi MR, Tiraihi T.** A morphometric study on the early stages of dendrite changes in the axotomized motoneuron of the spinal cord in newborn rats. *Neurol Res.* 2005;27:586-90. <http://dx.doi.org/10.1179/016164105X48743>
12. **Gustafsson B.** Changes in motoneurone electrical properties following axotomy. *J Physiol.* 1979;293:197-215. <http://dx.doi.org/10.1113/jphysiol.1979.sp012885>
13. **Laiwand R, Werman R, Yarom Y.** Electrophysiology of degenerating neurones in the vagal motor nucleus of the guinea-pig following axotomy. *J Physiol.* 1988;404:749-66. <http://dx.doi.org/10.1113/jphysiol.1988.sp017317>
14. **Mentis GZ, Díaz E, Morán LB, Navarrete R.** Early alterations in the electrophysiological properties of rat spinal motoneurons following neonatal axotomy. *J Physiol.* 2007;582:1141-61. <http://dx.doi.org/10.1113/jphysiol.2007.133488>
15. **Yan Q, Matheson C, López OT, Miller JA.** The biological responses of axotomized adult motoneurons to brain-derived neurotrophic factor. *J Neurosci.* 1994;14:5281-91.
16. **Kobayashi NR, Bedard AM, Hincke MT, Tetzlaff W.** Increased expression of BDNF and trkB mRNA in rat facial motoneurons after axotomy. *Eur J Neurosci.* 1996;8:1018-29. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1460-9568.1996.tb01588>
17. **Haas CA, Donath C, Kreutzberg GW.** Differential expression of immediate early genes after transection of the facial nerve. *Neurosci.* 1993;53:91-9. [http://dx.doi.org/10.1016/0306-4522\(93\)90287-P](http://dx.doi.org/10.1016/0306-4522(93)90287-P)
18. **Schmitt AB, Breuer S, Liman J, Buss A, Schlangen C, Pech K, et al.** Identification of regeneration-associated genes after central and peripheral nerve injury in the adult rat. *BMC Neurosci.* 2003;4:8-20. <http://dx.doi.org/10.1186/1471-2202-4-8>
19. **Urrego D, Múnera A, Troncoso J.** Retracción a largo plazo del árbol dendrítico de neuronas piramidales córtico-faciales por lesiones periféricas del nervio facial. *Biomédica.* 2011;31:560-9. <http://dx.doi.org/10.7705/biomedica.v31i4.440>
20. **Urrego D, Troncoso J, Múnera A.** Layer 5 pyramidal neurons' dendritic remodeling and increased microglial density in primary motor cortex in a murine model of facial paralysis. *Biomed Res Int.* 2015;2015:482023. <http://dx.doi.org/10.1155/2015/482023>
21. **Múnera A, Cuestas DM, Troncoso J.** Peripheral facial nerve lesions induce changes in the firing properties of primary motor cortex layer 5 pyramidal cells. *Neuroscience.* 2012;223:140-51. <http://dx.doi.org/10.1016/j.neuroscience.2012.07.063>
22. **Laskawi R, Rohlmann A, Landgrebe M, Wolff JR.** Rapid astroglial reactions in the motor cortex of adult rats following peripheral facial nerve lesions. *Eur Arch Otorhinolaryngol.* 1997;254:81-5. <http://dx.doi.org/10.1007/BF01526185>
23. **Franchi G.** Time course of motor cortex reorganization following botulinum toxin injection into the vibrissal pad of the adult rat. *Eur J Neurosci.* 2002;16:1333-48. <http://dx.doi.org/10.1046/j.1460-9568.2002.02195.x>
24. **Rappert A, Bechmann I, Pivneva T, Mahlo J, Biber K, Nolte C, et al.** CXCR3-dependent microglial recruitment is essential for dendrite loss after brain lesion. *J Neurosci.* 2004;24:8500-9. <http://dx.doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2451-04.2004>
25. **Shokouhi BN, Wong BZ, Siddiqui S, Lieberman AR, Campbell G, Tohyama K, et al.** Microglial responses around intrinsic CNS neurons are correlated with axonal regeneration. *BMC Neurosci.* 2010;11:13. <http://dx.doi.org/10.1186/1471-2202-11-13>
26. **Luo XG, Chen SD.** The changing phenotype of microglia from homeostasis to disease. *Transl Neurodegener.* 2012;1:9. <http://dx.doi.org/10.1186/2047-9158-1-9>
27. **Kettenmann H, Hanisch UK, Noda M, Verkhratsky A.** Physiology of microglia. *Physiol Rev.* 2011;91:461-553. <http://dx.doi.org/10.1152/physrev.00011.2010>
28. **Paxinos G, Watson C.** The rat brain in stereotaxic coordinates. 6th edition. London, UK: Academic Press; 2007.
29. **Raposo C, Schwartz M.** Glial scar and immune cell involvement in tissue remodeling and repair following acute CNS injuries. *Glia.* 2014;62:1895-904. <http://dx.doi.org/10.1002/glia.22676>
30. **Streit WJ, Graeber MB, Kreutzberg GW.** Functional plasticity of microglia: A review. *Glia.* 1988;1:301-7. <http://dx.doi.org/10.1002/glia.440010502>
31. **Wake H, Moorhouse AJ, Jinno S, Kohsaka S, Nabekura J.** Resting microglia directly monitor the functional state of synapses *in vivo* and determine the fate of ischemic terminals. *J Neurosci.* 2009;29:3974-80. <http://dx.doi.org/10.1523/JNEUROSCI.4363-08.2009>