



11281

26

**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS

**COTRANSMISIÓN PEPTIDÉRGICA EN
EL GANGLIO AUTONÓMICO**

T E S I S

**QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
DOCTOR EN CIENCIAS BIOMÉDICAS**

**P R E S E N T A :
MA. BEATRIZ JIMÉNEZ ANDREU**

**DIRECTOR DE TESIS: DR. MIGUEL A. MORALES MENDOZA
DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA CELULAR Y FISIOLÓGIA**

MÉXICO, D.F.

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

2002



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

AGRADECIMIENTOS

Esta tesis se realizó en el laboratorio del Dr. Miguel Morales a quien expreso mi profundo agradecimiento por su apoyo y valiosa asesoría.

El trabajo de cotutoría estuvo gentilmente realizado por la Dra. Clorinda Arias y el Dr. Francisco Pellicer.

La revisión de la tesis estuvo a cargo de los doctores: Raúl Mena, Elvira Galárraga, Gabriel Gutiérrez, Osvaldo Vindrola, Martha León y Milagros Méndez.

Gran parte del trabajo técnico de inmunofluorescencia, de cirugía y de análisis de imágenes fue realizado por la QFB. Ma. Elena Zetina, por el Sr. Pedro Medina y por el Ing. José Alfredo Hernández respectivamente.

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

ÍNDICE

RESUMEN	i
ABSTRACT	ii
INTRODUCCIÓN	1
ANTECEDENTES	6
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	10
HIPÓTESIS Y OBJETIVO	11
MATERIALES Y MÉTODOS	12
Procedimiento quirúrgico	12
Denervación preganglionar	12
Estimulación eléctrica	13
Uso del antagonista no peptidérgico SR48692	14
Fijación del tejido	14
Análisis de la dependencia de frecuencia y tiempo de la liberación y la internalización de NT	15
Inmunofluorescencia	15
Análisis morfológico semicuantitativo de la presencia, distribución y liberación de transmisores	17
Análisis confocal	18
RESULTADOS	20
Presencia de terminales preganglionares inmunoreactivas a ACh	20
Presencia de terminales inmunoreactivas a NT	22
Presencia de terminales inmunoreactivas a Met-ENK	22
Otros efectos de la denervación de los nervios preganglionares	25
Colocalización de inmunoreactividad de ChAT con NT y Met-ENK	27
Colocalización o confluencia de fibras inmunoreactivas a NT y Met-ENK	27
Patrones de distribución topográfica de botones IRChAT, NT y Met-ENK	30
Liberación e internalización de la NT en las neuronas ganglionares	
Principales por diferentes frecuencias de estimulación eléctrica preganglionar	31
Dependencia del acople de la NT a su receptor en la internalización de NT	32
Dependencia de tiempo para la internalización de NT	36
DISCUSIÓN	37
CONCLUSIONES	45
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	47

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

RESUMEN

Con inmunofluorescencia, microscopía de luz, microscopía confocal y análisis de imágenes, se estudió la presencia del transmisor clásico ganglionar simpático acetilcolina (Ach, por sus siglas en inglés) y de los péptidos neurotensina (NT, por sus siglas en inglés) y metionina encefalina (Met-ENK, por sus siglas en inglés) en las terminales preganglionares del ganglio estelar del gato, la posible coexistencia de estos tres mensajeros en los mismos botones, así como las frecuencias de estimulación eléctrica preganglionar necesarias para liberar a la NT y la posible internalización de este péptido en las neuronas blanco. Con microscopía de luz se detectaron fibras inmunorreactivas (IR) a colina acetiltransferasa (ChAT, por sus siglas en inglés), Met-ENK y Nt cercanas a las neuronas principales del ganglio IR a tirosina hidroxilasa (TH, por sus siglas en inglés). Cada mensajero se encontró en terminales distintas aunque también se detectaron escasos botones con colocalización. Asimismo se observaron somas celulares IRChAT e IRMet-ENK tanto positivas como negativas a TH. La denervación preganglionar tuvo dos efectos: la desaparición casi total de las fibras IR a los tres transmisores y la aparición de somas celulares IRNT, así como un aumento de somas IRChAT e IRMet-ENK. Las fibras IRChAT forman paquetes densos a lo largo de todo el ganglio con una distribución regional homogénea, mientras que la IRNT e IRMet-ENK presentan una distribución regional distinta y de alguna manera complementaria. El análisis al confocal con triple inmunomarca simultánea contra NT, Met-ENK y TH, mostró fibras independientes de NT y Met-ENK asociadas a neuronas diferentes o que convergen sobre una sola neurona. La NT puede ser liberada con frecuencias altas como 40 Hz y también con frecuencias bajas como 5 Hz, una vez liberada se internaliza en las células ganglionares por un proceso dependiente de receptor y de tiempo. Los resultados sugieren que la modulación (balance facilitación-inhibición) de la transmisión ganglionar se logra mediante la inervación selectiva y complementaria de botones que contiene a uno u otro modulador, más que por la inervación de botones que coalmacenen y coliberen a los moduladores y que la internalización puede formar parte del mecanismo de señalización de la NT.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

ABSTRACT

The presence of classical ganglionic transmitter acetylcholine (ACh), the peptides neurotensin (NT) and methionine enkephalin (Met-ENK) and their possible coexistence in preganglionic axon terminals of cat stellate ganglia as well as the frequencies required to release NT and its possible postsynaptic internalization were investigated by immunofluorescence, light and confocal microscopy and image analysis. Choline acetyltransferase (ChAT), NT and Met-ENK immunoreactivity (IR), was detected with light microscopy in axon terminals near tyrosine hydroxylase (TH) positive cells. ChATIR and Met-ENKIR were also detected in TH positive or negative cell bodies. Denervation of preganglionic nerves produced two effects: the almost complete elimination of IR fibers and an increase in the number of ChATIR and Met-ENKIR cell bodies, together with the appearance of NTIR cell bodies. ChAT, NT and Met-ENK are essentially stored in different nerve endings, although some co-occurrence was detected. ChATIR fibers form a dense network throughout the entire ganglion, with a homogeneous regional distribution. NTIR and Met-ENKIR networks of fibers were observed to have a distinct and somewhat complementary regional distribution. Further analysis with simultaneous triple labeling of NT, Met-ENK and TH and confocal microscopy showed fibers and boutons containing NT or Met-ENK either reach distinct neurons separately, or both converge onto the same cells. Image analysis showed that NT can be released at high frequencies like 40 Hz and at low frequencies such as 5 Hz. Once released, NT is internalized in ganglionic cells by a receptor-mediated, time-dependent process. These findings suggest that modulation (facilitation-inhibition balance) of ganglionic transmission is mainly achieved by the selective and complementary innervation of boutons containing each transmitter rather than by terminals and boutons containing and releasing both peptides, and that NT internalization can play a role in the mechanisms of NT signaling.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

INTRODUCCIÓN

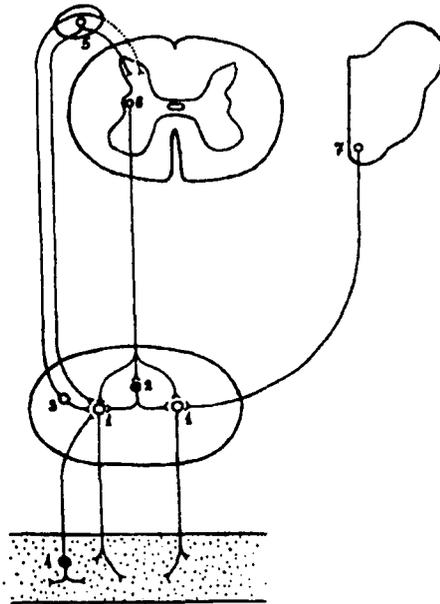
Desde los estudios clásicos de Langley (1921) sobre sistema nervioso autónomo, los ganglios autonómicos habían sido considerados como la estación de relevo monosináptico de la información motora visceral eferente. En 1935 Dale describió la farmacología básica del sistema nervioso autónomo, que consistía en sinapsis colinérgicas ganglionares con efectores neuroviscerales adrenérgicos simpáticos y colinérgicos parasimpáticos.

Este concepto prevaleció por mas de 30 años, sin embargo a partir de la década de los 60s se ha demostrado que estos ganglios tienen una organización morfo-funcional compleja; entre estas características morfo-funcionales están: la presencia de inervación sensorial (Quigg et al, 1990), así como la existencia de células ganglionares sensoriales que hacen conexión con neuronas del ganglio espinal y de los ganglios intramurales (Oldfield and McLachan, 1978); la presencia de interneuronas como las células pequeñas intensamente fluorescentes (células SIF, por sus siglas en inglés) (Eccles and Libet, 1961; Eränkő and Eränkő, 1971; Elfvin and Dalsgaard, 1977); la presencia de neuronas ganglionares colinérgicas (Sjoqvist, 1963; Lindh et al, 1986, Morales et al, 1995).

A este respecto, los datos encontrados en nuestro laboratorio (Nozdrachev et al, 2002, en prensa) sugieren que el ganglio estelar (GE) del gato no es un simple centro de relevo donde la información eferente que va hacia los órganos internos tiene una conexión sináptica de prendido o apagado, sino que es un importante centro integrativo en donde están presentes circuitos eferentes y aferentes, ya sea de paso o haciendo sinapsis con las neuronas del ganglio; asimismo, además de las vías aferentes preganglionares, desde médula espinal, también se encuentran aferencias desde la

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

médula oblongada, los ganglios espinales y los ganglios intramurales, estas últimas conexiones sugieren la posibilidad de la existencia de arcos reflejos víscera-víscera, lo que sugiere que este ganglio juega un papel determinante en la regulación de la actividad visceral. (Fig 1)



TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

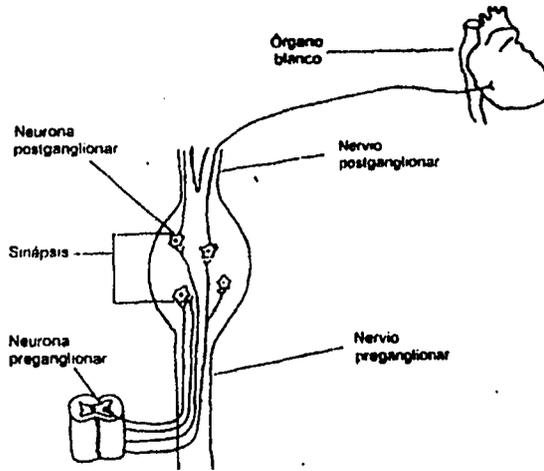
Figura 1. Esquema de las relaciones interneuronales de GE del gato y sus conexiones con diferentes partes del sistema nervioso: (1) neuronas principales del GE, (2) interneurona intraganglionar, (3) neurona del GE que proyecta al ganglio espinal y que probablemente continúa (líneas punteadas) hasta las raíces dorsales, (4) interneurona interganglionar del ganglio intramural que proyecta hacia el GE (5) neurona sensorial del ganglio espinal, (6) neurona simpática preganglionar, (7) neurona eferente de la formación reticular y del núcleo motor de la médula oblongada. (tomado de Nozdrachev et al, 2002, en prensa)

En relación con la farmacología de los ganglios simpáticos, también a partir de la década de los 60, se describió que además de la acetilcolina (ACh, por sus siglas en inglés) y la noradrenalina (NA, por sus siglas en inglés), en los ganglios se almacenaban otras sustancias bioactivas como aminas, purinas, gases y una gran

variedad de péptidos (Burnstock et al, 1964; Hökfelt et al, 1977; Hökfelt et al, 1986), las cuales podían actuar inhibiendo o facilitando la actividad desencadenada por estos dos transmisores sobre sus células o tejidos blanco; a esta propiedad de la sinapsis se le dio el nombre de cotransmisión o neuromodulación.

A los neurotransmisores principales como la ACh y la NA se les llamó transmisores clásicos y a los otros mensajeros se les denominó cotransmisores o neuromoduladores (Kupfermann, 1991). La cotransmisión dio lugar a la reconsideración de los códigos químicos de la transmisión sináptica ganglionar, ya que a partir de entonces se tuvo que describir una vía o un núcleo de neuronas por la presencia no sólo de su transmisor clásico, sino también por la combinación de sus cotransmisores.

En este trabajo revisamos el código químico, presencia del transmisor principal ACh y de los péptidos cotransmisores neurotensina (NT por sus siglas en inglés) y Metionina-encefalina (Met-ENK por sus siglas en inglés), en la sinapsis ganglionar simpática establecida entre los botones de las terminaciones axónicas de las neuronas preganglionares, cuyos somas se encuentran en el núcleo intermediolateral de la médula espinal, y, las dendritas y somas de las neuronas principales del ganglio, las cuales mandan sus axones al músculo liso de vísceras, glándulas y vasos sanguíneos, así como al músculo cardíaco (McLachan, 1995) (Fig.2).



TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Figura 2. Esquema del ganglio simpático. Se muestran las terminales preganglionares y los axones de las neuronas principales del ganglio que inervan al órgano blanco, así como la sinapsis que se establece entre estos dos grupos de células.

Con respecto a las terminales preganglionares que vienen de médula espinal, se sabe que además de ACh, almacenan y liberan de sus botones sinápticos, varios péptidos (Gibbins, 1992; Elfvin et al, 1993; Benarroch, 1994; Morales et al, 1995; Klimaschewki et al, 1996; Lundberg, 1996), también se ha demostrado que pueden coalmacenar en el mismo botón más de un péptido como por ejemplo, el polipéptido vasoactivo intestinal (VIP, por sus siglas en inglés) y el péptido del gen relacionado con la calcitocina (CGRP, por sus siglas en inglés) (Morales et al, 1995).

Aunque se ha descrito una gran cantidad de péptidos en las sinapsis ganglionares, aún no se conoce el efecto modulador de todos ellos. Una característica de los péptidos detectados en los ganglios autonómicos es su distribución heterogénea (Gibbins, 1992; Heym et al, 1993) lo que sugiere que las neuronas ganglionares están sometidas a diferentes influencias moduladoras, dependiendo de la combinación de

mensajeros que las contactan (Gibbins, 1992). Este autor describe cuatro grupos de inervación preganglionar en los ganglios lumbares de cobayo:

1) fibras que contienen sustancia P (SP, por sus siglas en inglés) y se asocian a la inervación de neuronas ganglionares no adrenérgicas que contienen VIP y neuropéptido Y (NPY, por sus siglas en inglés) y que proyectan hacia los vasos sanguíneos (vasodilatadoras); 2) fibras que contienen CGRP que inervan neuronas ganglionares adrenérgicas y que proyectan hacia los lechos vasculares del músculo esquelético (vasoconstrictoras). 3) fibras que contienen encefalinas que inervan todos los tipos de neuronas ganglionares y 4) fibras que contienen VIP que inervan neuronas adrenérgicas que contienen NPY y que proyectan hacia la piel (pilomotoras).

En el presente trabajo analizamos el proceso de cotransmisión en la sinapsis del ganglio simpático estelar del gato. Se sabe que en las terminaciones preganglionares de este ganglio, están presentes ACh y varios péptidos como somatostatina (SS, por sus siglas en inglés), NT, SP, VIP, factor liberador de corticotropina (CRF, por sus siglas en inglés), leucina encefalina (Leu-ENK por sus siglas en inglés) y Met-ENK, (Bachoo et al, 1987; Morales et al, 1993).

De entre estos péptidos nosotros analizamos a la NT y a la Met-ENK, los cuales tienen una función neuromodulatoria antagónica; mientras la Met-ENK inhibe la transmisión sináptica ganglionar, la NT, la facilita (Prosdocimi et al, 1986; Bachoo et al, 1988; Zhang et al, 1995). La manera en cómo estos péptidos interactúan con la ACh para ejercer su efecto neuromodulatorio no ha sido del todo dilucidada. Existe la duda de si la ACh es coalmacenada con los péptidos en los mismos botones axónicos y de ahí son liberados diferencialmente de acuerdo a la frecuencia de estimulación; o si por

el contrario, se almacenan en botones diferentes, los cuales pudieran converger sobre las mismas neuronas.

La investigación que aquí se presenta sobre la cotransmisión ganglionar de ACh, NT y Met-ENK, incluye el análisis de: a) la posible presencia de vías o patrones de distribución regional de la inervación colinérgica y peptidérgica; b) la presencia de colocación vs complementaridad como patrón de organización en la inervación de estos dos péptidos; c) la dinámica de liberación de ambos péptidos, en particular la dependencia de la frecuencia de estimulación; y d) la internalización de estos péptidos en sus neuronas blanco.

ANTECEDENTES

Neurotensina y Metionina encefalina

La NT y la Met-ENK son péptidos ampliamente distribuidos en el sistema nervioso (Hwlett et al, 1981; Shi & Bunney, 1992). Para la NT se han descrito dos tipos de receptores, uno de alta afinidad (NT1, $K_d = 0.13$ nM) y otro de baja afinidad (NT2, $K_d = 2.4$ nM), los cuales pueden ser bloqueados por el antagonista competitivo SR4869 (Kitabgi et al, 1987; Gully et al, 1993; Mazella et al, 1996);. Estos receptores membranales son receptores acoplados a proteínas G, la unión de la NT a sus receptores tiene tres efectos: 1) incremento del GMPc; 2) decremento del AMPc; y 3) incremento de la concentración intracelular de IP_3 (Vincent, 1992).

Una vez liberada, la NT es degradada por una peptidasa llamada 3.4.24.16 o neuroolisina que puede ser secretada por los astrocitos o estar asociada a la membrana postsináptica y degradar a la NT en la hendidura sináptica, asimismo se ha encontrado esta enzima en el citosol o asociada a membrana de mitocondrias, por lo que el péptido puede ser degradado en el interior de la célula (Vincet et al, 1996; Rioli et al, 1998).

Otro mecanismo de inactivación de la NT es la internalización del complejo NT-receptor en sus células blanco, este proceso de internalización se ha demostrado *in vitro* y con NT exógena en distintas áreas del sistema nervioso incluido el GE del gato, (Alonso et al, 1994; Beaudet et al, 1994; Chabry et al, 1994; Faure et al, 1995; Bachoo et al 1996).

Este fenómeno de internalización del complejo NT-receptor es dependiente de tiempo y de temperatura, el proceso de endocitosis es mediado por clatrina y se lleva a cabo desde las dendritas hasta la región perinuclear (Beaudet et al, 1994; Faure et al, 1995; Vandenbulke et al, 1998).

En cuanto a la Met-ENK, se han descrito tres receptores: μ , κ y δ ; la activación del receptor κ inhibe la conducción de Ca^{++} a través de canales sensibles a voltaje, los receptores δ y μ por su parte, inhiben a la adenil ciclasa. Estos efectos pueden ser bloqueados por la acción de la naloxona, antagonista de los tres receptores (Benarroch, 1994; Klimaschewki et al, 1996). La Met-ENK tiene una afinidad diferente para cada uno de los receptores a opioides: la K_d para el receptor δ es de 4.4 nM, para el μ es de 8 nM y para el κ es de 835 nM (Chang & Cuatrecasas, 1981).

Una vez que la Met-ENK se libera de las terminales presinápticas, es degradada por la peptidasa 24.11 o encefalinasa en el espacio intersináptico (Waters et al, 1995). Aunque se ha descrito la internalización de los receptores a opioides tanto *in vivo* como *in vitro* en sus células blanco (Sternini et al, 1996; Keith et al, 1998), hasta ahora sólo hay un reporte sobre la internalización de la Met-ENK en sus células blanco después de tratamiento crónico con morfina en cultivos primarios de neuronas corticales de rata y

se cree que este proceso de internalización se da través de receptores tipo δ (Cahill et al, 1999).

Efectos moduladores ganglionares de la NT y Met-ENK

Como se mencionó anteriormente, en relación con la NT, se ha reportado que las terminales preganglionares del GE del gato son inmunoreactivas al péptido (Bachoo et al, 1987; Caverson et al, 1989; Morales et al, 1993; Carbó et al, 1997). Este neuropéptido puede ser liberado en una manera dependiente de calcio, ya sea por despolarización con alto K^+ o por estimulación eléctrica a 10 Hz o frecuencias más altas; adicionalmente, si la estimulación eléctrica se prolonga por más de 10 min, la liberación de la NT alcanza hasta un 65% y las terminales recuperan su contenido original en un período de 6-8 días (Maher et al, 1991; Maher et al, 1994).

Con respecto al efecto modulador de la NT, se ha reportado que este péptido facilita la transmisión sináptica ganglionar, esta facilitación en el GE, tiene como consecuencia un aumento en la frecuencia cardiaca (Bachoo et al, 1987).

En cuanto a la Met-ENK, se ha reportado su presencia en las terminales preganglionares tanto del ganglio cervical superior y estelar de rata y de gato (Prosdocimi et al, 1986; Lindth et al, 1988; Morales et al, 1995).

La Met-ENK puede ser liberada de manera dependiente de calcio tanto por una despolarización con alto K^+ , como por estimulación eléctrica a frecuencias bajas de entre 0.2-5 Hz (Zhang et al, 1993); su liberación produce una inhibición de la transmisión sináptica ganglionar. Al igual que la NT si la estimulación eléctrica se sostiene por varios minutos (80 min.), el efecto de inhibición desaparece, lo que sugiere un vaciamiento del péptido.

La inhibición de la transmisión ganglionar en el caso del GE, se traduce en un descenso de la frecuencia cardiaca (Prosdocimi et al, 1986; Zhang et al, 1995). Además, se ha demostrado que tanto la aplicación exógena como la liberación endógena de este péptido inhibe la liberación de Ach de las terminales preganglionares (Zhang et al, 1995).

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Una serie de preguntas relevantes de la biología celular surgen al estudiar la cotransmisión y neuromodulación sináptica, en este trabajo investigamos algunas de ellas:

Dada la naturaleza colinérgica de la transmisión ganglionar y la coexistencia de varios cotransmisores en los mismos botones, nos preguntamos si en estos botones colinérgicos coexisten péptidos con función moduladora antagónica, como la NT y Met-ENK. Como alternativa a esta coexistencia pudiera darse que cada uno de estos dos péptidos se almacene en botones diferentes. Ambas alternativas conllevan al cuestionamiento de cómo se alcanza el adecuado balance de estos efectos moduladores antagónicos. En el caso de la coexistencia, debería de existir algún mecanismo diferencial de liberación (por ejemplo, dependencia de la frecuencia y duración de la estimulación), aunque también el balance pudiera llevarse a cabo postsinápticamente (por ejemplo de acuerdo al tipo y distribución de receptores). Para la situación de almacenamiento en botones distintos, sería de esperarse algún patrón específico de distribución topográfica de la inervación, que produzca este balance.

Adicionalmente y en relación con los mecanismos de acción de los péptidos, nos preguntamos si la internalización por las neuronas blanco, reportada para los péptidos aplicados exógenamente, es válida para el caso de los péptidos endógenamente liberados; y si esta internalización es dependiente del acople péptido-receptor.

HIPÓTESIS

- Dada la capacidad de las terminales presinápticas para ejercer un efecto modulador de facilitación-inhibición a través de cotransmisores de función antagónica, es de esperarse que exista una estrecha regulación de este balance, esto puede lograrse gracias a:

- Que existan botones con cada transmisor, que inerven diferencialmente a la población ganglionar ó
- que haya coexistencia en los mismos botones y que los péptidos se liberen con activación distinta ó
- que la liberación sea indiferenciada y que la selectividad dependa de las neuronas blanco

- Dentro del proceso de inervación peptidérgica, la internalización neuronal de algunos péptidos puede ser una etapa de enlace entre el acople al receptor y la señalización celular.

OBJETIVO

Para entender mejor los posibles mecanismos de transmisión peptidérgica, en este trabajo estudiamos con simple y múltiple marcaje inmunofluorescente, microscopía confocal y procesamiento digital de imágenes, si existe ó no colocación de la ACh, NT y Met-ENK en los mismos botones y si estos botones siguen un patrón específico de distribución topográfica a lo largo del ganglio; por otra parte exploramos la dinámica de liberación de estos péptidos, particularmente su dependencia de frecuencia de

estimulación y finalmente la posible internalización neuronal postganglionar de ambos péptidos como parte de su efecto neuromodulatorio sobre las células blanco.

MATERIALES Y MÉTODOS

En este trabajo se utilizaron para todos los experimentos ganglios estelares (GE) de gatos de uno y otro sexo (2.5-4.5 Kg). En los experimentos de estimulación y de denervación se usó un ganglio como control (no estimulado o no denervado) y el contralateral como ganglio experimental (estimulado o denervado).

Procedimiento quirúrgico.

Los animales fueron anestesiados con pentobarbital sódico (35 mg/Kg-i.p. seguida de una dosis de mantenimiento de 3 mg/Kg x h, i.v.), traqueostomizados y ventilados artificialmente después de ser paralizados con bromuro de pancuronium (dosis inicial de 200 µg/Kg i.v. y una dosis de mantenimiento de 100 µg/Kg cada dos horas i.v.). Se canalizaron la arteria y vena femoral para el registro continuo de la tensión arterial y para la administración de drogas respectivamente. La temperatura medida rectalmente fue mantenida a 36-37°C con calor local. Con una incisión entre la primera y segunda costilla, y después de remover los músculos intercostales y la segunda costilla, se identificó el ganglio estelar sobre la pleura.

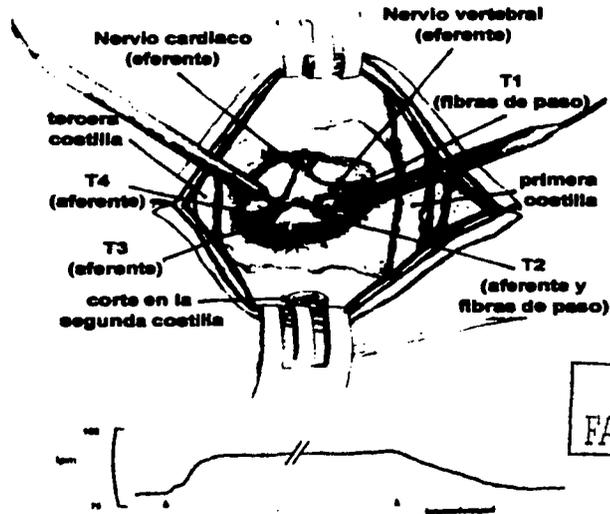
Denervación preganglionar, experimentos crónicos.

Con el objeto de confirmar la presencia de los tres transmisores en las terminales preganglionares, en algunos experimentos (n=14), los animales fueron entubados vía laringeo-traqueal, se denervó uno de los GE a través de seccionar la cadena simpática torácica desde la rama comunicante blanca torácica (T2) a T4, se cerró la herida y se le

dio cuidado postoperatorio con antibióticos y analgésicos. Después de 7 días, los animales se perfundieron y extrajeron los ganglios para procesarlos para inmunofluorescencia (ver más adelante).

Estimulación eléctrica.

En 10 animales, una vez identificado el ganglio, se expuso la cadena simpática de T2 a T4. La estimulación eléctrica se aplicó a través de un par de electrodos bipolares de plata en forma de ganchos colocados uno en la cadena torácica simpática que incluyó T3WR y T4WR y el otro en T2WR. La estimulación consistió en trenes de pulsos cuadrados de 0.5 ms de duración, generados desde un estimulador Grass S88 a través de una unidad de aislamiento, a dos frecuencias: 5 y 40 Hz por 160 y 20 minutos respectivamente con el propósito de mantener el mismo número de pulsos (48,000 pulsos) en las dos condiciones experimentales. Para probar la correcta estimulación, la frecuencia de la respuesta cardíaca fue continuamente registrada en un tacógrafo Grass, generada por el pulso de la tensión arterial Sólo se estimuló un ganglio, el contralateral se usó como control o no estimulado.(Fig 3). Con la finalidad de evitar la interferencia de actividad de fibras pregangliónicas que posiblemente tengan conexiones interganglionares, y de suprimir toda actividad central, se denervaron las fibras pregangliónicas de ambos ganglios (estimulado y control) antes de empezar la estimulación eléctrica.



TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Figura 3. Esquema de la estimulación eléctrica de las fibras pregangliónicas del GE izquierdo del gato, a) se muestra el ganglio con sus diferentes nervios, así como la localización de los electrodos, b) registro de la frecuencia cardíaca. Cuando comienza la estimulación (flecha izquierda) se produce un aumento de la frecuencia que se mantiene durante la estimulación y regresa a niveles basales (flecha derecha) cuando ésta termina. Escala: 2 min.

Uso del antagonista de NT no péptidérgico SR48692.

Con el objeto de analizar la posibilidad de que la internalización de la NT fuera un proceso mediado por su receptor, en algunos experimentos (n=10), se aplicó el antagonista no peptídico a receptores de NT SR48692 (donado por D Gully) una hora antes de la estimulación (75 $\mu\text{g}/\text{Kg}$ i.v).

Fijación del tejido.

Veinte minutos después de haber finalizado la estimulación, los animales se perfundieron transcárdiacamente con 300 ml de una solución amortiguadora de fosfatos (0.01 M, PB pH 7.4) por 3 min seguida de 1000 ml de una solución PB 0.1 M más paraformaldehído al 2% y ácido pícrico al 0.18% pH 7.4, 300 ml por 3 min y 700 ml por

45 min. Después de la perfusión los ganglios fueron extraídos, se les removió el tejido conectivo y se les colocó para postfijación en la misma solución por 12 hrs para luego crioprotegerlos por inmersión en una solución de sacarosa al 30% hasta que el tejido alcanza el fondo de la solución (12 hrs).

Análisis de la dependencia de frecuencia y tiempo en la liberación e internalización de NT.

Para determinar las posibles diferencias entre la liberación de NT a diferentes frecuencias se analizaron cortes de GEs de experimentos de frecuencias de 40 (n=5) y 5 (n=5) Hz con y sin la aplicación del antagonista SR48692. Con la finalidad de estudiar si la internalización de la NT pudiera ser un fenómeno dependiente de tiempo, en algunos experimentos de 40 Hz (n=8), los gatos se perfundieron después de diferentes tiempos luego de haber terminado la estimulación: a los 0, 20 120 min y a las 24 hs. Para los experimentos de 24 hs, una vez terminada la estimulación se cerró la herida y se dio cuidado postoperatorio.

Inmunofluorescencia.

En un crióstato a -20 °C, se hicieron cortes longitudinales de 14 μm de cada ganglio, que fueron colocados en laminillas recubiertas con gelatina procesados para inmunofluorescencia con el siguiente procedimiento: los cortes fueron preincubados por una hora con suero normal de cabra al 10% o con albumina bovina al 5% e incubados con el anticuerpo primario toda la noche para series de simple inmunofluorescencia contra: colina acetil-transferasa (ChAT por sus siglas en inglés) como marcador de ACh, Met-ENK y NT; para doble marcaje contra: ChAT y Met-ENK, ChAT y NT, ChAT y TH, Met-ENK y NT, Met-ENK y TH, NT y TH; para triple marcaje contra Met-ENK, NT y

TH. Después de tres lavados de 10 min con PBS 0.01M, los cortes se incubaron con el anticuerpo secundario por dos horas. Luego de tres lavados de 10 min cada uno con PBS 0.01 M, los cortes fueron montados con el medio de montaje antidesvanecimiento de fluorescencia vectashield (Vector).

Para algunos de los experimentos de marcaje contra Met-ENK, los cortes se contratiñeron con azul de Evans el cual, además de ser visible en color azul en campo claro, en fluorescencia se observa en rojo con el filtro de excitación/emisión de 568/585 nm. Como control, algunos cortes de cada ganglio se procesaron siguiendo todos los pasos descritos anteriormente con excepción de la incubación del anticuerpo primario. Los anticuerpos usados para el marcaje inmunofluorescente se presentan en la tabla 1.

Tabla 1. Anticuerpos usados para el marcaje inmunofluorescente

Antisuero contra Primario	Tipo de anticuerpo	Acoplado	Dilución	Origen
NT (sintético)	rata policlonal	---	1:500	Protos Biotech New York, NY
NT (oveja)	conejo policlonal	---	1:500	Incstar. Stillwater MN
Met-ENK (oveja)	conejo policlonal	---	1:1000	Donado por M. Asai
ChAT (humano)	cabra policlonal	---	1:250	Chemicon. Temecula CA
TH (rata) Secundario	ratón monoclonal	---	1:25	Chemicon.
α IgG de conejo	cabra	FITC	1:500	Sigma. St. Louis, MO
α IgG de rata	cabra	FITC	1:500	Accurate. Westbury, NY
α IgG de conejo	cabra	Texas Red	1:200	Vector. Burlingame, CA
α IgG de cabra	conejo	FITC	1:50	Zymed. San Francisco CA
α IgG ratón	cabra	Cy5	1:100	Zymed

Análisis morfológico semicuantitativo de la presencia, distribución y liberación de transmisores.

Tanto para los estudios de frecuencias como para los experimentos de distribución topográfica, con los sistemas de análisis de imágenes HistocomX (Biocom) y Metamorph (Universal Image Co), la inmunofluorescencia generada por los procesos celulares se separó de los niveles de grises del fondo de la preparación a través de establecer un umbral de intensidad de luminosidad determinado visualmente para cada preparación, sólo las áreas con intensidad de luminosidad sobre umbral fueron analizadas.

Para determinar la distribución topográfica de las fibras IRChAT, IRNT e IRMet-ENK se usaron 14 animales: 7 con simple inmunomarcaje fluorescente contra ChAT y 7 con doble inmunomarcaje fluorescente simultáneo contra NT y Met-ENK. Se tomó un corte de una serie de varios cortes sobre el eje medio lateral seleccionado al azar y se analizó a bajo aumento. Para ello, el corte del ganglio que incluyó el área total, se dividió en cuatro regiones iguales: caudal (A), dorsomedial (B), craneal (C) y ventromedial (D) las cuales corresponden a las zonas cercanas a las principales conexiones del ganglio, llamadas tercera (T3) y segunda (T2) ramas torácicas comunicantes blancas, nervio cardiaco (CN por sus siglas en inglés) y nervio vertebral (VN por sus siglas en inglés) respectivamente. El valor de la inmunorreactividad en el total de cada corte, medido como el valor de gris (correspondiente a la intensidad de la fluorescencia) se tomó como el 100% y la cantidad de inmunorreactividad encontrada en cada región se expresó como porcentaje de dicho valor total. Las diferencias de la inmunorreactividad entre los tres transmisores se determinaron calculando y comparando el porcentaje del área total del ganglio ocupada por la inmunorreactividad

para cada uno de los mensajeros, las comparaciones se hicieron con una prueba *t* de Student no pareada.

Para los experimentos de liberación e internalización dependiente de frecuencia y tiempo, de cada una de las regiones del ganglio se eligieron con el aumento de 20X dos zonas representativas para analizar (8 por corte). El nivel de luminosidad integrado producido por la inmunorreactividad de las terminales de las preparaciones control (ganglios no estimulados) se tomó como el 100%; los datos de la inmunorreactividad de las terminales de las preparaciones de las otras dos condiciones (ganglios estimulados con y sin el uso del antagonista al receptor de NT) se expresaron como porcentaje del valor de las preparaciones control. Las comparaciones se hicieron con una prueba *t* de Student no pareada.

Análisis confocal.

Algunos cortes seleccionados de ganglios experimentales y control y experimentos de estimulación con 40 Hz con y sin el uso del antagonista a receptores de NT y con diferentes tiempos de perfusión, se observaron en un microscopio Nikon invertido (60X) acoplado a un sistema confocal de dos láseres, Kriptón y Argón (Biorad). De cada región observada se obtuvieron cortes ópticos seriados de 1 μm de grosor sobre el eje Z que fueron colectados en una longitud de onda para los de una sola marca y de dos ó tres para los de doble y triple marca, con los niveles de excitación/emisión correspondientes para FICT (488/522 nm), Texas Red (56/-585 nm) y Cy5 (647/680 nm). Las imágenes digitalizadas fueron procesadas con el programa Confocal Assistant en donde las imágenes se proyectaron en un plano bidimensional y se hizo un montaje usando un despliegue de pseudocolor que muestra FITC en verde,

Texas Red en rojo y Cy5 en azul. La sobreposición de las marcas dio los siguientes colores: amarillo para verde-rojo, violeta para rojo-azul, turqueza para verde-azul y blanco para cuando había coincidencia de los tres colores.

RESULTADOS

1. Presencia de terminales presinápticas inmunorreactivas a Ach.

Con inmunofluorescencia se confirmó la presencia de inmunorreactividad a ChAT (IRChAT) en las fibras preganglionares del GE del gato. En preparaciones control encontramos una extensa y abundante red de fibras en forma de cadenas en el neuropilo entre las neuronas principales inmunorreactivas a TH (IRTH) a lo largo de prácticamente todo el tejido ganglionar. Estas redes están formadas por paquetes de muchas fibras o de unas cuantas distribuidas homogéneamente en todo el ganglio (fig 4). Sin embargo, cuando las preparaciones se observan a un mayor aumento, encontramos que esta distribución no es homogénea, observamos células que están inervadas de manera diferente por las fibras IRChAT: mientras unas están abundantemente rodadas, hay otras que prácticamente no están asociadas a estas fibras (Fig 4 a y b). Asimismo, la inmunorreactividad a ChAT se encontró en somas de algunas neuronas ganglionares, las cuales también están rodeadas por fibras IRChAT, estas neuronas son escasas, alrededor de 1% de la población total y se encuentran por todo el ganglio (Fig 4 a y c) y aunque la mayoría de estas células son TH negativas, encontramos que algunas de ellas son positivas a ambos transmisores simultáneamente (Fig 4 c y d). El origen preganglionar de las fibras IRChAT se confirmó denervando los axones preganglionares por siete días, lo cual eliminó casi por completo la inmunorreactividad a ChAT (Fig 4 e y f).

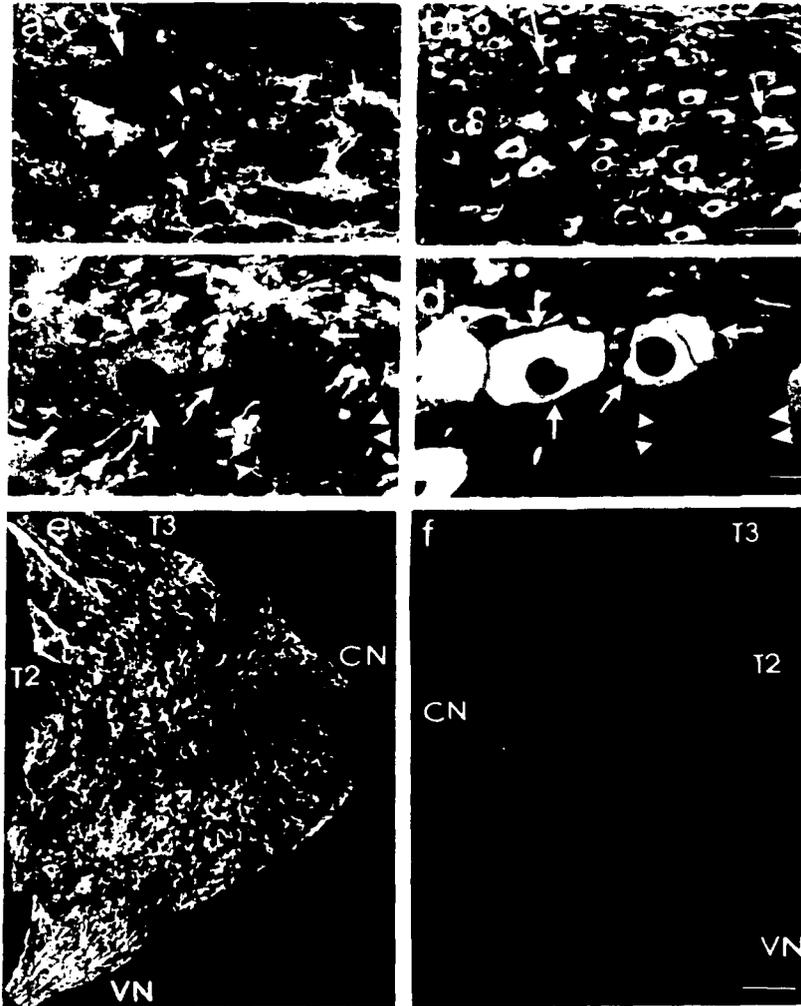


Figura 4. Micrografías de fluorescencia e imágenes de microscopía confocal de cortes del GE del gato marcadas contra ChAT (a, c y e) y TH (b, d y f) simultáneamente. Se encontraron dos patrones de distribución principales: en (a) y (b) se distinguen paquetes de fibras gruesos o delgados cercanos a las células ganglionares IRTH (flechas), nótese que estos paquetes de fibras también están cercanos a neuronas IRChAT y TH negativas (cabezas de flecha). Al análisis con microscopía confocal se encontraron dos tipos de neuronas ganglionares IRChAT (c, d), células reactivas a ChAT y TH simultáneamente (flechas) y células reactivas sólo a ChAT (cabezas de flecha). En (e) se muestra el patrón de distribución de la IRChAT en una sección control de todo el ganglio, la denervación de los axones preganglionares siete días antes, suprimió casi por completo la inmunomarca de ChAT (f). Cal: 50 μm para a-b, 25 μm para c-d y 500 μm para e-f. (Tomada de Jiménez et al, 2002)

2. Presencia de terminales pregangliónicas inmunorreactivas a NT.

Con inmunofluorescencia confirmamos la presencia de inmunorreactividad a NT (IRNT) en las fibras preganglionares del GE del gato. En preparaciones control la marca se encontró como una red de fibras IRNT que corre por el neuropilo distribuidas de una manera heterogénea en el ganglio, con una densidad mayor en las zonas cercanas a la salida del nervio vertebral y a la entrada de T2 y T3 (Fig 5 A). En las preparaciones analizadas a mayor aumento se encontraron patrones distintos de distribución de estas fibras: paquetes gruesos de fibras cercanas a las neuronas principales del ganglio, cadenas finas o gruesas rodeando una o un grupo de células ganglionares reactivas a TH; no se encontraron somas IRNT (Fig 5 B, D). El origen preganglionar de la NT se confirmó denervando los axones preganglionares por siete días, lo cual eliminó por completo la IRNT (Fig 5 C)

3. Presencia de terminales pregangliónicas inmunorreactivas a Met-ENK

Con inmunofluorescencia confirmamos la presencia de inmunorreactividad a Met-enk (IRMet-ENK) en las fibras preganglionares del GE del gato (Fig 6 y 7). Se encontraron fibras IRMet-ENK de diferentes longitudes y grosores, las cuales corren a lo largo del neuropilo al lado o rodeando un grupo o una sola neurona ganglionar reactivas a TH. También encontramos estas fibras formando círculos concéntricos alrededor de una sola neurona, estas neuronas son en su mayoría TH negativas y ChAT positivas (Fig 6 a-b y 7 d-e). Con análisis al confocal a través del eje Z encontramos que estos círculos muestran un arreglo espiral, que se extiende en todo el grosor del corte (14 μm) (Fig 7 a-c). Asimismo encontramos algunos somas de las neuronas principales del ganglio positivos a Met-ENK, rodeadas por una abundante

cantidad de fibras IRChAT, de estas neuronas, la mayoría son TH positivas con diferente nivel de inmunorreactividad, pero también se encontraron neuronas IRMet-ENK y negativas a TH (Fig 6 c-d). El origen preganglionar de la IRMet-ENK se confirmó denervando los axones preganglionares por 7 días, lo cual eliminó casi por completo la marca a Met-ENK (Fig 6 e y f)

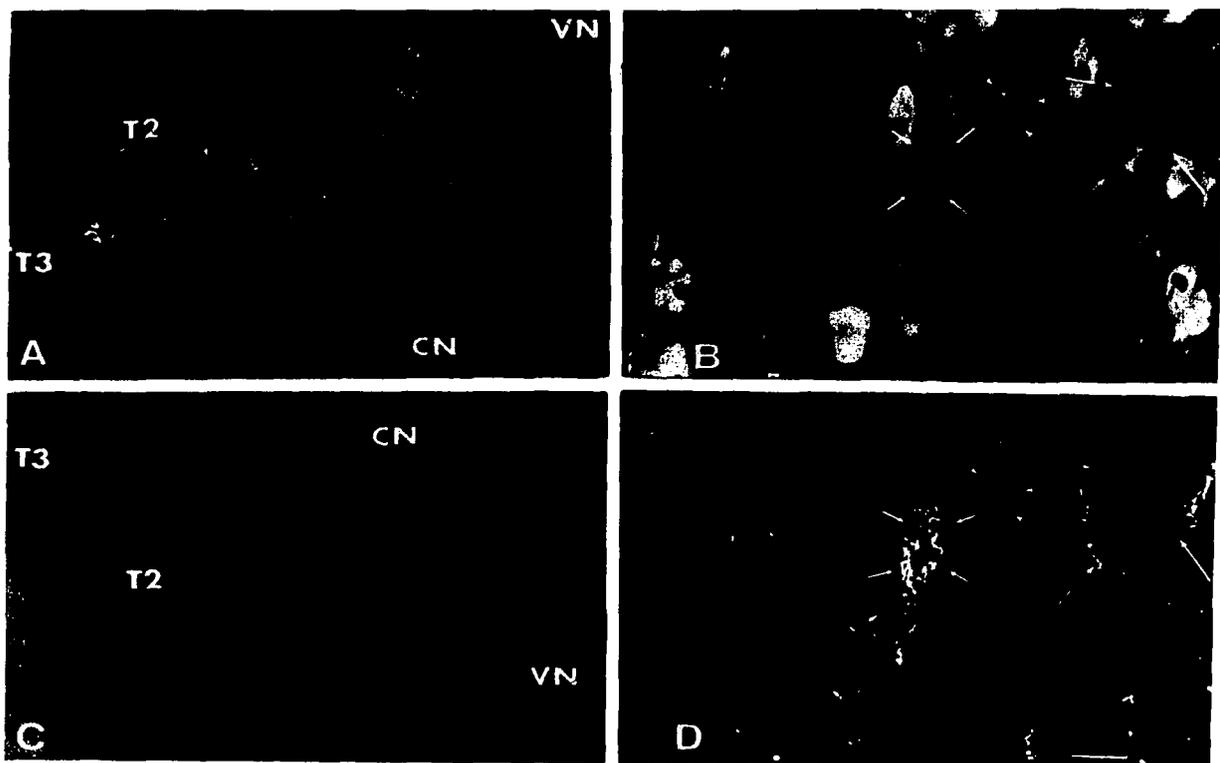
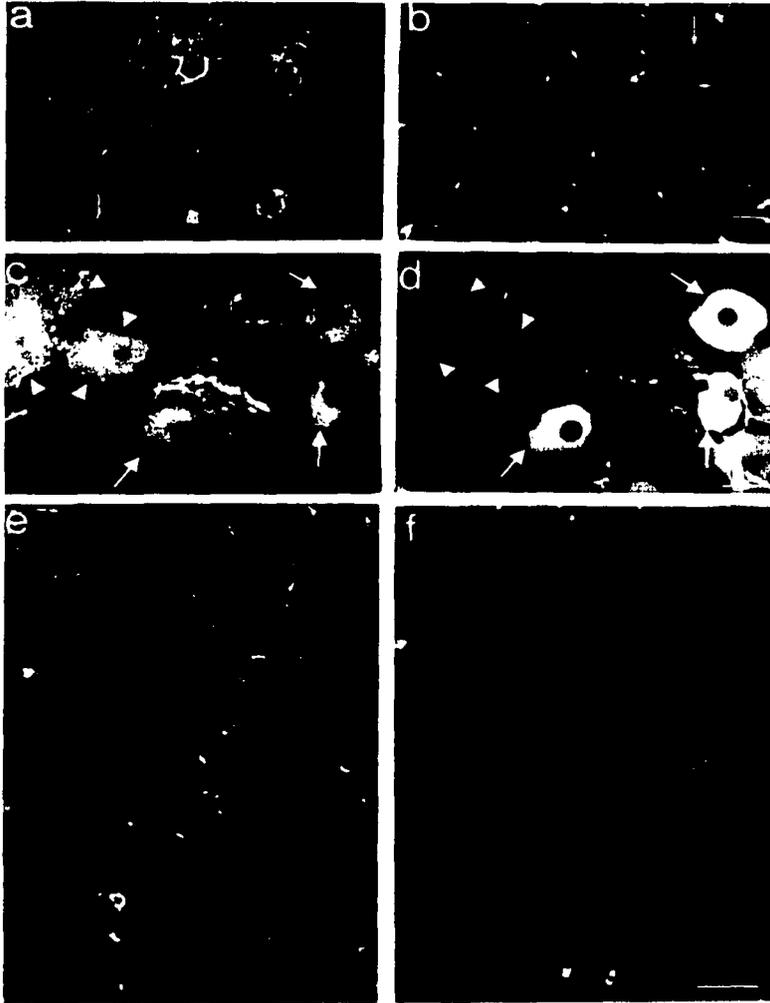
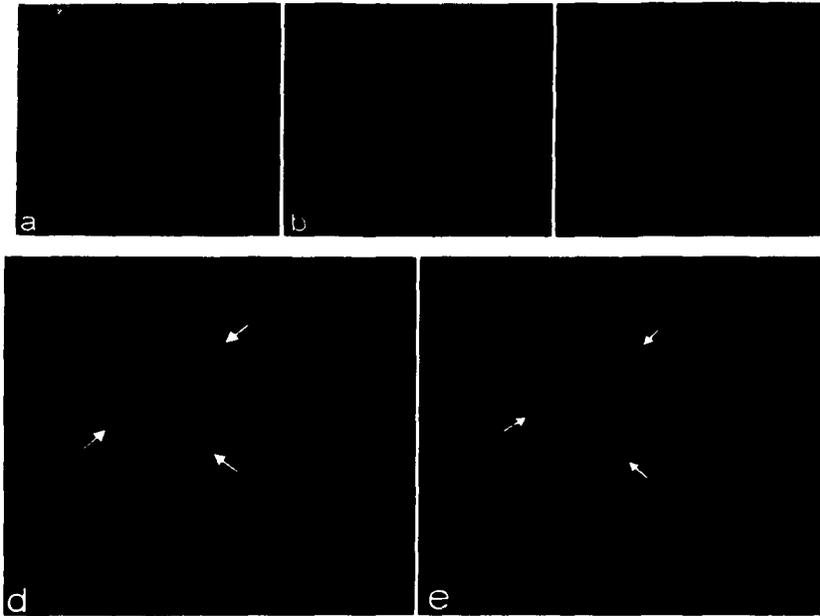


Figura 5. Micrografías de fluorescencia de cortes del GE del gato inmunorreactivas a NT(A, C y D) y TH (B) simultáneamente. (A) patrón de distribución de la IRNT en una sección control de todo el ganglio, nótese una mayor densidad en las zonas cercanas a la salida del nervio vertebral (VN) y de la entrada de las principales aferencias al ganglio T2 y T3 en contraste con la ausencia de estas fibras en la salida del nervio cardiaco (CN). (C) la denervación de los axones preganglionares siete días antes eliminó por completo la IRNT. En una preparación con doble marcaje simultáneo contra TH (B) y contra NT (D) se muestran los patrones de distribución de la IRNT: paquetes de muchas fibras cercanas a las neuronas IRTH (flechas), fibras IRNT rodeando dos o más células reactivas a TH (flechas delgadas) o una sola neurona (cabezas de flecha). Cal: 500 μ m para A-C y 50 μ m para B-D. (Tomada de Zetina et al, 1999)



TESIS CON
 FALLA DE ORIGEN

Figura 6. Micrografías de fluorescencia e imágenes de microscopía confocal del GE del gato marcadas contra Met-ENK y TH. Se encontraron dos patrones de distribución de la IRMet-ENK (**a, b**), fibras delgadas que corren entre las células principales del ganglio IRTH y fibras en formaciones circulares concéntricas alrededor de neuronas TH negativas (**flechas delgadas**). Con análisis con microscopía confocal se encontraron dos tipos de neuronas ganglionares IRMet-ENK (**c, d**), células reactivas a Met-ENK y a TH simultáneamente (**flechas**) y células reactivas sólo a Met-ENK (**cabezas de flecha**). El patrón de distribución de la Met-ENK en una sección control del ganglio tomada a bajo aumento se observa en (**e**), la denervación siete días antes suprimió casi por completo la inmunomarca de Met-ENK sin afectar la de TH (**f**). Cal: 50 μm para a-b, 25 μm para c-d y 100 μm para e-f (Tomada de Jiménez et al, 2002).



TESIS CON
 FALLA DE ORIGEN

Figura 7. Imágenes de microscopía confocal de cortes del GE del gato reactivas a Met-ENK y ChAT. (a-c) cortes 4, 8 y 12 de una serie de 12 cortes ópticos ($1\ \mu\text{m}$) reactivos a Met-ENK (verde) y contrateñidos con azul de Evans (ilustrada por pseudocolor en azul), nótese la formación circular de fibras IRMet-ENK alrededor de los somas celulares. Cortes con doble marcaje inmunofluorescente simultáneo contra ChAT (c) y Met-ENK (d) donde se muestra una neurona IRChAT (**asterisco**) rodeada por fibras IRChAT e IRMet-ENK. Cal: $25\ \mu\text{m}$ (Tomada de Jiménez et al, 2002, en prensa)

4. Otros efectos de la denervación de los nervios preganglionares

Además de la remoción de las fibras IRChAT, IRNT e IRMet-ENK, con la denervación de los nervios preganglionares por siete días encontramos un aumento de un 50% de neuronas IRMet-ENK así como la aparición de neuronas IRNT. Estas neuronas reactivas a NT fueron muy pocas, menos del 1% de la población total y como en el caso de las neuronas IRChAT e IRMet-ENK, encontramos también algunas simultáneamente reactivas a TH y otras sólo reactivas al péptido; en el ganglio contralateral (inervado) no encontramos neuronas IRNT. Otro efecto de la denervación fue el incremento aunque moderado, de las neuronas IRChAT acompañado de un

correspondiente decremento de las neuronas positivas a TH, asimismo se encontró que en el ganglio inervado, las pocas células simultáneamente reactivas a ChAT y TH se incrementaron de manera considerable después de la denervación (Fig 8)

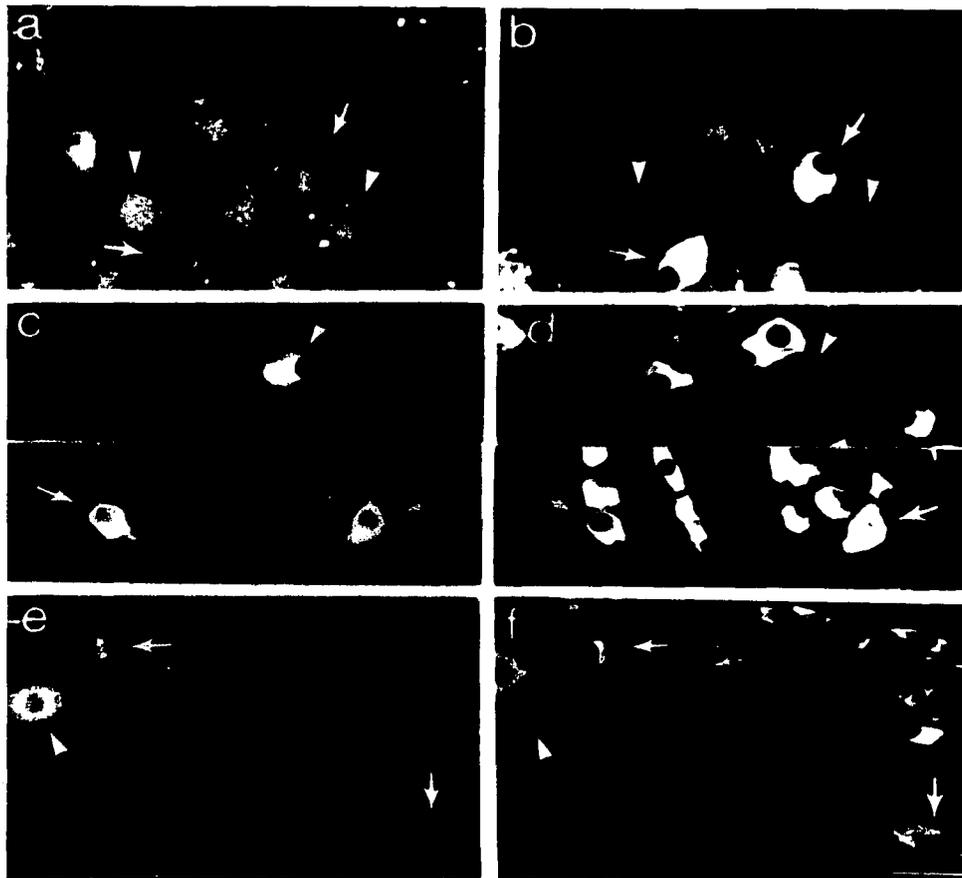


Figura 8. Micrografías de fluorescencia de cortes del GE del gato con doble marcaje simultáneo contra ChAT y TH, Met-ENK y TH y NT y TH donde se muestra el efecto de la denervación sobre la IR de las células. En el caso de la ChAT se incrementó el número de células simultáneamente reactivas a ambos transmisores (**flechas**) y positivas sólo a ChAT (**cabezas de flecha**) (a-b). El mismo efecto de aumento en número se encontró para las células IRMet-ENK de ambos tipos, TH positivas (**flechas**) y negativas (**cabezas de flecha**) (c-d). En relación a la NT, se encontró la aparición de células IRNT tanto TH positivas (**flechas**) como TH negativas (**cabezas de flecha**) (e-f). Cal: 50 μ m (Tomada de Jiménez et al, 2002).

5. Co-localización de inmunorreactividad de ChAT con NT y Met-ENK.

Con doble inmunomarcaje fluorescente simultáneo contra ChAT y NT o contra ChAT y Met-ENK y análisis con microscopía confocal, encontramos que la mayoría de los botones a lo largo de todo el tejido ganglionar presentan una inmunorreactividad independiente a cada uno de los transmisores con muy poca co-localización entre ellos (Fig 9). Aún en las regiones donde se encuentra una gran cantidad de fibras IRChAT, éstas no co-localizan ni con NT ni con Met-ENK; asimismo se observaron botones reactivos a cada uno de los péptidos pero negativos a ChAT.

6. Co-localización o confluencia de fibras inmunorreactivas a NT y Met-ENK

Con triple inmunomarca simultánea (NT, Met-ENK y TH) y con análisis con microscopía confocal observamos un intrincado patrón de distribución de IRNT e IRMet-ENK con escasa presencia de botones con coexistencia de ambos péptidos. Los botones inmunorreactivos a cada uno de los péptidos se encuentran en una confluencia espacial entre ellos y con las células ganglionares formando paquetes de fibras y botones que corren entre ellas de forma independiente (Fig 10 a-c) donde sólo muy pocos botones muestran co-existencia de ambas inmunorreactividades (Fig 10 d-f). Este análisis con microscopía confocal nos permitió detectar una aposición cercana de terminales IRNT e IRMet-ENK con los somas de las células IRTTH. Se encontraron en su mayoría, neuronas preferentemente asociadas a botones inmunorreactivos a NT o a Met-ENK (Fig 10 h) aunque también pudimos observar neuronas asociadas a ambos péptidos simultáneamente (Fig 10 g).

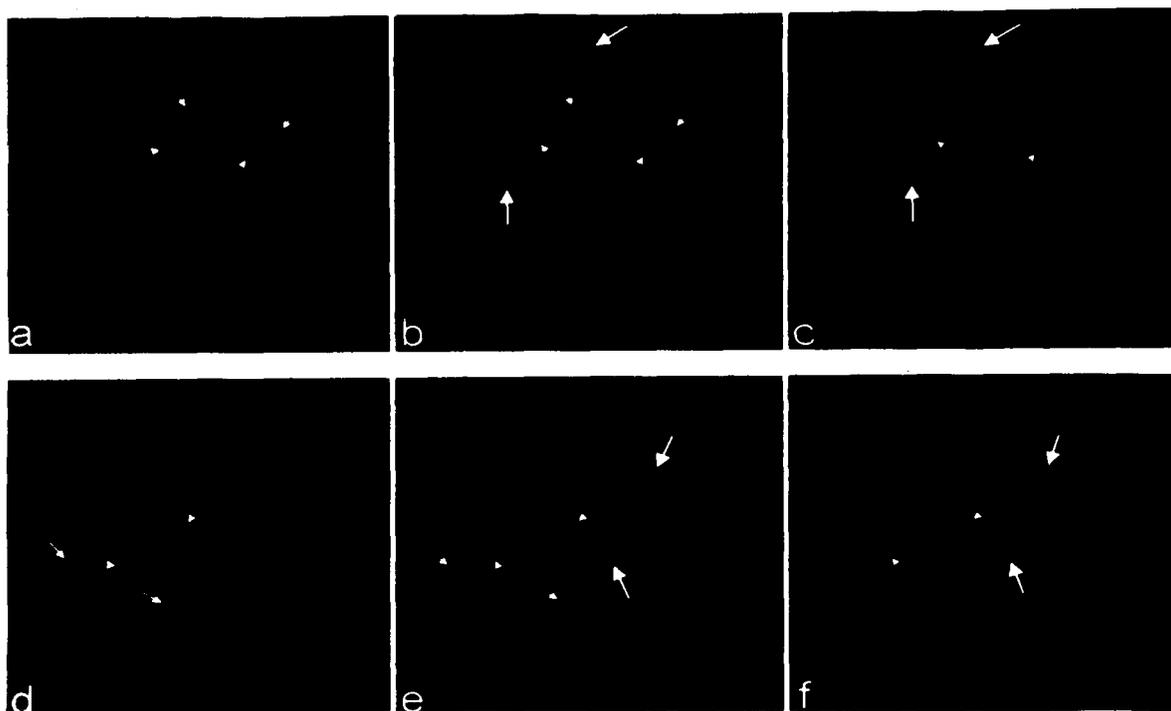


Figura 9. Imágenes de microscopía confocal con doble inmunomarcaje simultáneo de cortes del GE del gato (cortes ópticos de $1\ \mu\text{m}$) inmunorreactivas a ChAT (Texas Red, rojo), a NT y Met-ENK (FITC, verde) donde se muestra la localización y colocalización de las fibras reactivas a los tres transmisores. **(a y d)** fibras IRChAT negativas a NT o Met-ENK (**flechas delgadas**). Fibras IRNT **(c)** e IRMet-ENK **(f)** negativas a ChAT (**flechas gruesas**). **(b y e)** sobreposición digital de ambos canales (verde y rojo) en donde los puntos amarillos (**cabezas de flecha**) corresponden a los botones en los que coexisten los dos transmisores. Cal: a-c $15\ \mu\text{m}$, d-f $25\ \mu\text{m}$ (Modificada de Jiménez et al, 2002)

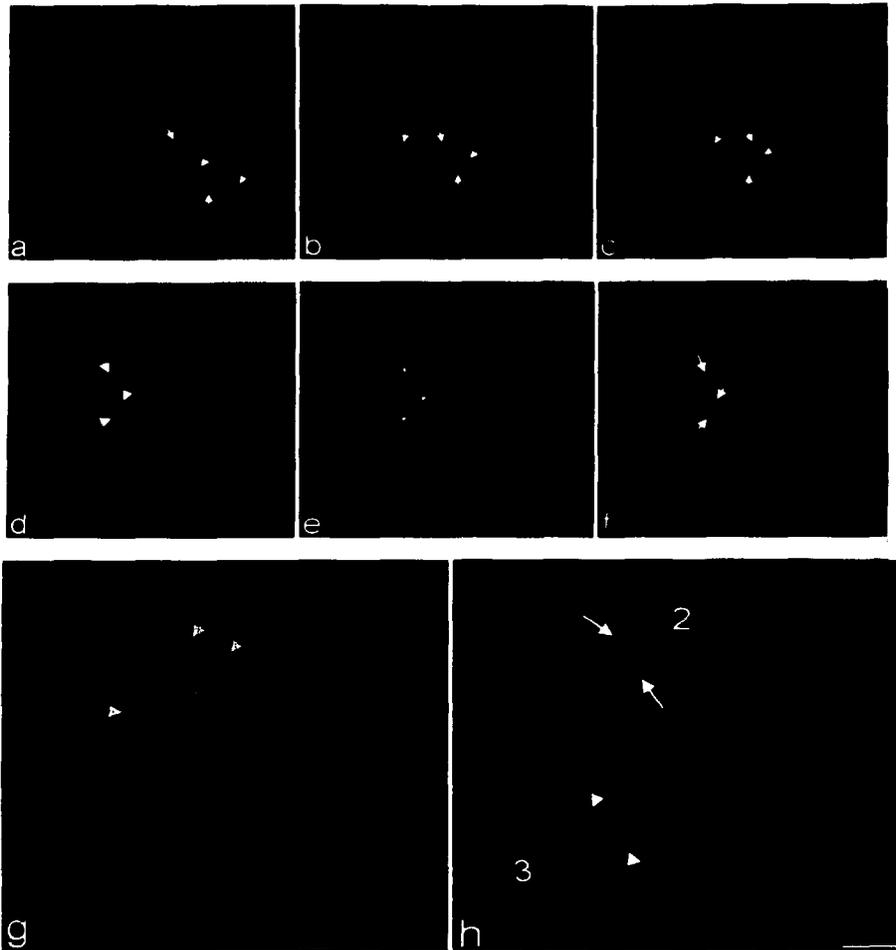


Figura 10. Imágenes de microscopía confocal con triple inmunomarcaje simultáneo de cortes del GE del gato inmunorreactivas a NT (FITC, verde), Met-ENK (Texas Red, rojo) y TH (Cy5, azul) La hilera **a-c** muestra una selección de cortes ópticos de diferente nivel sobre el eje Z (3, 6 y 10 de una serie de 14 cortes de 1 μm , grosor del corte 14 μm) en donde se observa que aunque las fibras IRNT (**flechas**) o IRMet-ENK (**cabezas de flecha**) corren paralelas y de manera muy cercana en un mismo paquete, conservan su independencia. La hilera **d-f** muestra la co-existencia de IRNT-Met-ENK, (**d**) fibras reactivas sólo a Met-ENK (**cabezas de flecha**), (**f**) fibras reactivas sólo a NT (**flechas**) y (**e**) sobreposición digital de ambos canales (verde y rojo) en donde los puntos amarillos (**flechas delgadas**) corresponden a los sitios en donde coexisten los dos péptidos. En (**g**) y (**h**) se distinguen tres tipos de aproximaciones de fibras y botones reactivos a NT o Met-ENK a las neuronas ganglionares principales reactivas a TH: (**1**) neuronas con acercamiento de ambos tipos de fibras (NT **flechas** y Met-ENK **cabezas de flecha**) y (**2**) y (**3**) con acercamiento de fibras inmunorreactivas a NT o a Met-ENK. Cal: 20 μm para **a-f** y 10 μm para **g-h** (Tomada de Jiménez et al, 2002).

7. Patrones de distribución topográfica de botones IRChAT, NT, y Met-ENK

Con doble inmunomarca simultánea para NT y Met-ENK y simple marca para ChAT se exploró la distribución topográfica de la IRChAT, IRNT e IRMet-ENK en el ganglio (Fig 11), para lo cual, de acuerdo al método antes descrito (ver Métodos) se dividió el ganglio en cuatro regiones iguales (A) caudal, (B) dorsomedial, (C) craneal (D) ventromedial y se determinó el nivel de la intensidad de la fluorescencia encontrada para cada transmisor estudiado. Se encontró una aparente distribución complementaria de botones inmunorreactivos a ambos péptidos; mientras que la IRMet-ENK es más abundante en las regiones ventromedial y craneal (D: $43.1 \pm 1.9\%$; C: 27.1 ± 1.3) comparada con las regiones dorsomedial y caudal (B: $12.4 \pm 1.2\%$; A: $17 \pm 1.1\%$, $p < 0.05$) (Fig 11 b), la IRNT mostró la menor concentración precisamente en las regiones D y C (D: $10 \pm 1.2\%$; C: $19.1 \pm 0.9\%$) y los mayores niveles se detectaron en las regiones A y B (A: $39.3 \pm 0.7\%$; B: $30 \pm 1\%$, $p < 0.05$) (Fig 11 c). Con respecto a las fibras IRChAT encontramos una distribución prácticamente homogénea para las cuatro regiones ganglionares (A: $23.8 \pm 1.1\%$; B: $25.9 \pm 1.9\%$; C: $26.7 \pm 1.1\%$; D: $23.3 \pm 1.9\%$) (Fig 11 a). En relación con la cantidad de IR detectada para cada transmisor encontramos una diferencia estadísticamente significativa ($p < 0.05$) entre cada uno de ellos, el porcentaje del área ocupada por la IR fue de: $13.68 \pm 1.31\%$ para ChAT; de $3.20 \pm 0.33\%$ para NT y de sólo $0.92 \pm 0.4\%$ para Met-ENK (Fig 11).

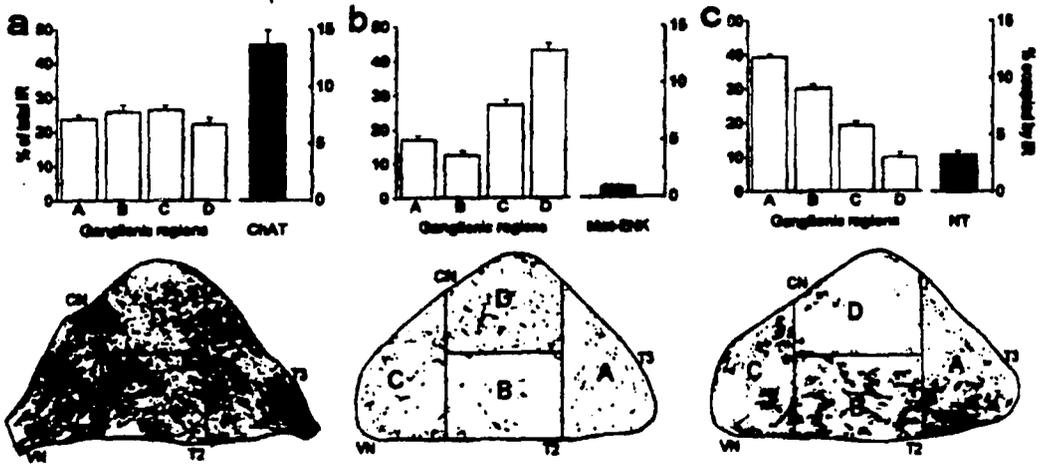


Figura 11. Gráficas y figuras digitalizadas de imágenes del patrón de distribución regional de fibras IRChAT (a), Met-ENK (b) y NT (c) en cortes del ganglio estelar del gato. El promedio y error estándar de siete ganglios en cada gráfica muestra el análisis digital de la distribución de cada inmunorreactividad (IR) en las cuatro regiones iguales en las que fue dividido el ganglio: caudal (A), dorsomedial (B), craneal (C) y ventromedial (D), las cuales corresponden a las zonas cercanas a las principales proyecciones del ganglio llamadas tercera (T3) y segunda (T2) ramas torácicas comunicantes blancas, nervio cardiaco (CN) y nervio vertebral (VN). Los valores de cada región expresan el porcentaje de la totalidad de la IR detectada en cada corte; del lado derecho se muestra el porcentaje del área total del corte ocupada por la IR. La cantidad de fibras IR de cada transmisor fue significativamente diferente ($p < 0.05$) para cada uno de los mensajeros de acuerdo a la siguiente relación: ChAT>NT>Met-ENK. Con relación a la distribución regional, mientras que ChAT se distribuye de manera homogénea en todas las regiones, Met-ENK y NT muestran una distribución significativamente diferente ($p < 0.05$) entre las regiones y de alguna manera complementaria, nótese que en las regiones donde hay mayor concentración de Met-ENK (C y D) son las de menor presencia de NT y viceversa. Abajo se muestran ejemplos de estos patrones de distribución regional en imágenes digitalizadas de cortes de ganglios en donde los puntos negros corresponden a las fibras y terminales reactivos a cada transmisor (Tomada de Jiménez et al, 2002).

8. Liberación e internalización de la NT en las neuronas ganglionares principales por diferentes frecuencias de estimulación eléctrica preganglionar.

En relación con las frecuencias necesarias para liberar la NT preganglionar, con análisis de imágenes, hemos confirmado que la estimulación eléctrica con 40 Hz por 20 min, reduce significativamente las fibras reactivas al péptido en relación con la preparación control (100%) a un $7.4 \pm 2.0\%$; asimismo encontramos que la estimulación

con una frecuencia de 5 Hz por 160 min también reduce significativamente la IRNT a un $19.2 \pm 2.3\%$ (Fig 12 y Fig 13 A, B y C).

Adicionalmente hemos observado que a diferencia de las preparaciones control (ganglio no estimulado), en el ganglio estimulado hay células que se toman IRNT después de la estimulación, precisamente en las zonas donde más se reducen las terminales reactivas al péptido; las características esféricas y el diámetro de 40 a 50 μm , indica que estas neuronas corresponden a las neuronas ganglionares principales (Fig 13 A, B y C). Con análisis de imágenes encontramos que estas células marcadas con NT alcanzan el $53.3 \pm 8.9\%$ para 40 Hz y un $19.9 \pm 4.0\%$ para 5 Hz de la NT control encontrada en las terminaciones de preparaciones no estimuladas (Fig 12). La observación de células de ganglios estimulados con 40 Hz al microscopio confocal mostró la IRNT en forma de gránulos intensamente fluorescentes de distintos tamaños (0.5-2 μm) acumulados alrededor del núcleo con mayor concentración en un polo del perímetro nuclear (Fig 14 A, C y E).

9. Dependencia del acople de la NT a su receptor para su internalización.

Para investigar el papel del acople de la NT a su receptor en la internalización de NT estudiamos el efecto del antagonista SR48692 al receptor de NT. Los ganglios estimulados con 40 Hz, 20 min y con 5 Hz, 160 min, bajo el efecto del antagonista, también mostraron una reducción de las fibras inmunorreactivas a NT similar a la encontrada en los experimentos sin la aplicación del antagonista: para 40 Hz la reducción fue de $11.0 \pm 5.2\%$ (7.4% sin el antagonista) y para 5 Hz fue de $38.1 \pm 9.3\%$ (19.2% sin el antagonista) en relación con la medida control. (Fig 12)

En cuanto a los somas encontramos un decremento estadísticamente significativo, $p < 0.05$ en la inmunorreactividad con respecto a los ganglios no tratados con el antagonista: $21.0 \pm 4.4\%$ (40 Hz) y $11.0 \pm 2.4\%$ (5 Hz) en comparación con $53.3 \pm 8.9\%$ (40 Hz sin el antagonista) y $19.9 \pm 4.0\%$ (5 Hz sin antagonista). (Fig 12 y Fig 13 D y E)

El análisis con microscopía confocal, mostró una clara reducción en la intensidad de la marca a NT en gatos tratados con el antagonista (Fig 14 B, D y F).

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

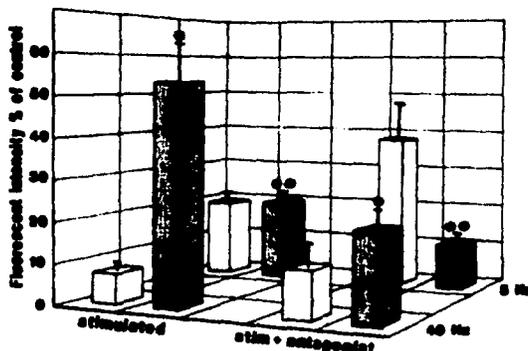


Figura 12. Gráfica que muestra la reducción de fibras IRNT y la internalización de la NT en las células ganglionares después de una estimulación con 40 Hz por 20 min y de 5 Hz por 160 min con y sin la presencia del antagonista al receptor de NT SR48692. Las barras blancas representan el contenido de la NT en las terminales preganglionares, mientras que las barras grises muestran el contenido de la NT en los somas de las células ganglionares. Nótese que mientras las fibras IRNT son claramente reducidas en comparación con el 100% de las preparaciones control por ambas frecuencias de estimulación con 40>5 Hz, el soma de las células ganglionares se convierte en el sitio de la IRNT bajo las dos condiciones. Como en el caso de la liberación de las terminales preganglionares, 40 Hz muestra una mayor internalización que 5 Hz. El uso del antagonista reduce significativamente este proceso de internalización en ambas condiciones. *, ** diferencias significativas con una $p > 0.05$. (Tomada de Zetina et al, 1999).

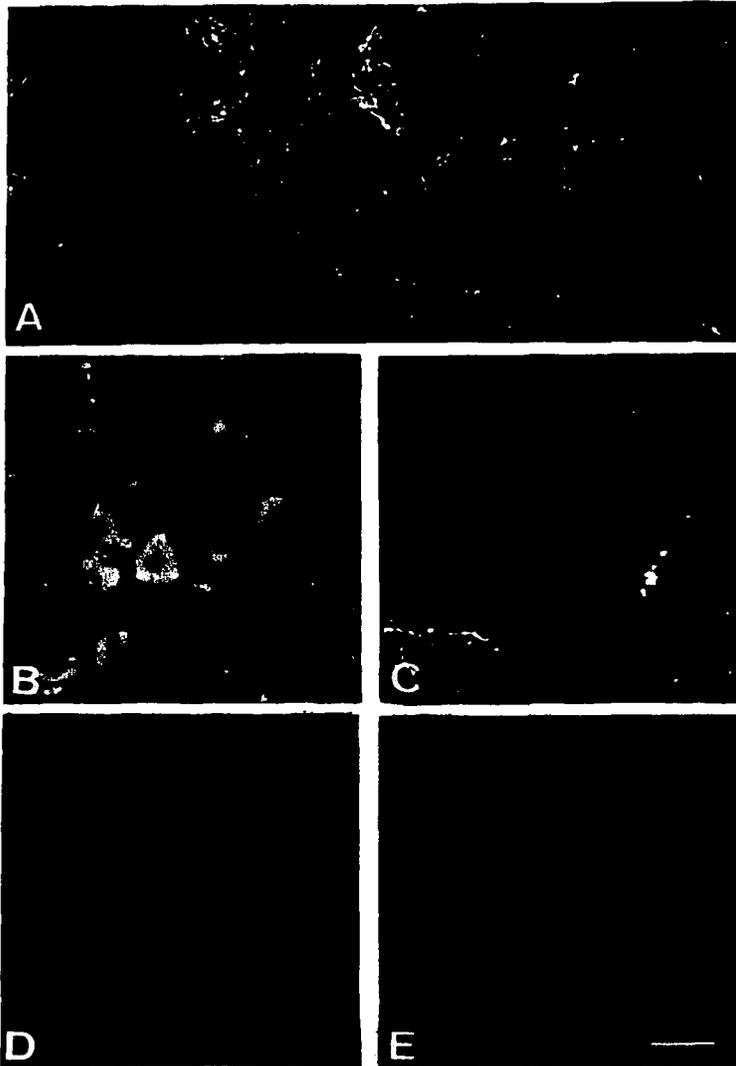


Figura 13. Micrografías de fluorescencia del corte del GE del gato que muestran la reducción de fibras IRNT y la internalización en las células ganglionares después de la estimulación eléctrica preganglionar con y sin el uso del antagonista al receptor SR48692. **(A)** preparación control, **(B)** ganglio estimulado con 40 Hz por 20 min, **(C)** ganglio estimulado con 5 Hz por 160 min, **(D)** ganglio estimulado con 40 Hz + antagonista y **(E)** ganglio estimulado con 5 Hz + antagonista. En estas micrografías se puede observar la disminución de las fibras IRNT y la aparición de células reactivas al péptido **(B y C)** y la disminución de la intensidad de los somas marcados después del uso del antagonista **(D y E)**. Cal: 50 μ m. (Tomado de Zetina et al, 1999).

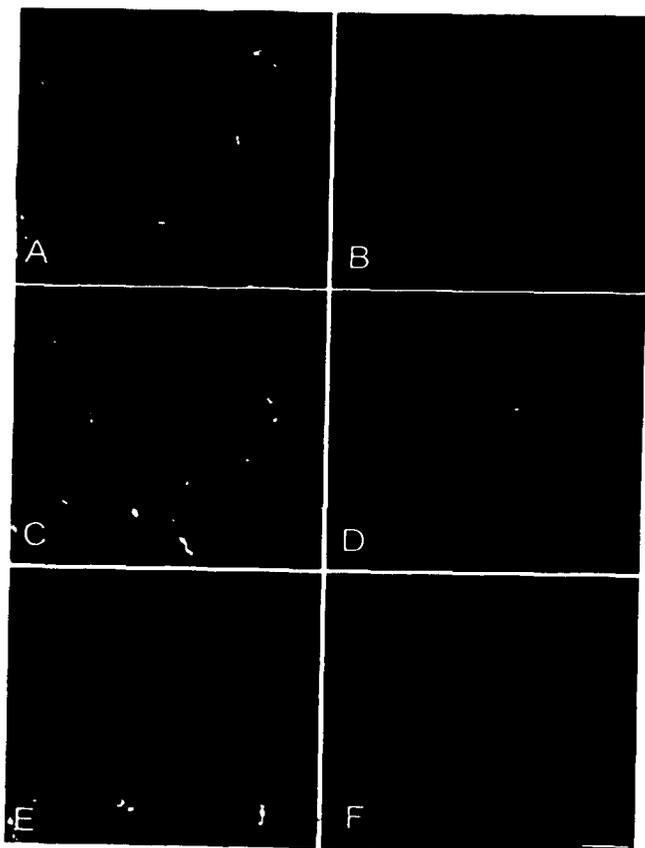
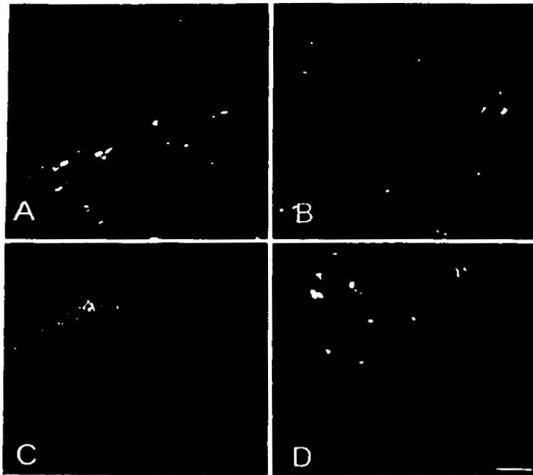


Figura 14. Imágenes de microscopía confocal de cortes del GE del gato reactivas a NT después de una estimulación eléctrica preganglionar con 40 Hz por 20 min (A, C, E) y con la acción del antagonista al receptor de NT SR48692 (B, D, F). Los paneles corresponden a las secciones 4, 8 y 12 de 14 cortes ópticos seriados uno cada μm . Se observa una clara diferencia tanto en la intensidad como en el número de gránulos intracelulares reactivos a NT entre las preparaciones estimuladas y las preparaciones con la presencia del antagonista. Cal: 10 μm (Tomada de Zetina et al, 1999).

10. Dependencia de tiempo para la internalización de NT.

Con inmunofluorescencia y análisis de imágenes confirmamos la dependencia temporal de la internalización de la NT descrita previamente (Faure et al, 1995a) sin que se detecten cambios en el vaciamiento del péptido de las terminales preganglionares. Encontramos que cuando el ganglio se fija inmediatamente después de la estimulación (40 Hz), la detección del péptido es prácticamente nula; cuando el ganglio se fija a los 20 min hay una internalización del 56% y después de 120 min, la internalización tiene su punto máximo de 83%, finalmente cuando el ganglio se fija a las 24 horas de haber terminado la estimulación, observamos que la internalización inicia su desvanecimiento quedando sólo un 32% (Fig 15).



TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

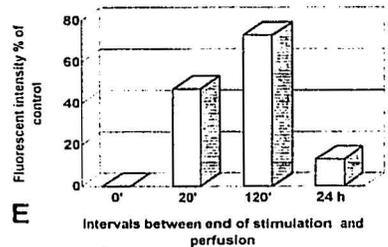


Figura 15. Imágenes de microscopía confocal de cortes del GE de gato reactivas a NT obtenidos de ganglios fijados a los 0, 20, 120 min y 24 hrs después de terminar la estimulación (40 Hz, 20 min) (A a D respectivamente). (E) gráfica que muestra el porcentaje de internalización de NT en las células de estos ganglios Cal: 10 μ m. (modificada de Zetina et al, 1999).

DISCUSIÓN.

Los presentes datos muestran la presencia y distribución regional de ACh (a través del marcaje de la enzima ChAT), de los péptidos NT y Met-ENK así como la posible coexistencia entre ellos en el ganglio estelar del gato. Con inmunofluorescencia, procesamiento de imágenes y análisis con microscopía confocal, demostramos que las terminales y botones sinápticos almacenan preferentemente sólo uno de los tres transmisores y en muy pocos casos, dos de ellos son coalmacenados en los mismos botones.

Además, cada mensajero muestra un patrón topográfico de distribución diferente. También se muestra que la NT puede ser liberada no sólo con estimulación eléctrica de altas frecuencias como 40 Hz, sino con frecuencias que se encuentran dentro del rango de los tonos fisiológicos (2-8 Hz) como 5 Hz. Finalmente se demuestra, por primera vez *in vivo* la internalización neuronal postsináptica de la NT endógena liberada por estimulación eléctrica de las fibras preganglionares.

Como se esperaba, la distribución de las fibras IRChAT fue homogénea a lo largo del ganglio, sin embargo, aunque detectadas en todas partes, estas fibras tienden a formar redes densas alrededor de una o varias neuronas ganglionares, estos tipos diferentes de asociaciones entre las fibras colinérgicas y las neuronas ganglionares han sido descritas con anterioridad en otros ganglios y en otras especies (Lindh et al, 1986; Morales et al, 1995; Sann et al, 1995). Estos datos apoyan la propuesta de una organización química de la población neuronal ganglionar, al contrario de la postura tradicional que presentaba al ganglio como un solo núcleo de neuronas encargadas sólo del relevo motor eferente autonómico (Langley, 1921).

Otro dato que apoya la organización química en el ganglio es el hecho de que la mayoría de las fibras IRChAT no son reactivas ni a NT ni a Met-ENK, lo cual sugiere tres posibilidades: una, que haya subpoblaciones de neuronas preganglionares colinérgicas que no sintetizan estos péptidos; que existan neuronas solamente peptidérgicas y finalmente que estas últimas pudieran sintetizar otro transmisor clásico como GABA, dopamina u otros.

También detectamos algunas neuronas ganglionares positivas a ChAT, la mayoría de ellas negativas a tirosina hidroxilasa (TH por sus siglas en inglés) como se ha reportado en el ganglio estelar de rata y cobayo (Morales et al, 1995; Sann et al, 1995). Se sabe que estas neuronas colinérgicas inervan las glándulas sudoríparas de los cojinetes de las patas de los gatos y los vasos del músculo esquelético (Lindh and Hökfelt, 1990; Morales et al, 1995). Se ha propuesto que estas neuronas son inicialmente noradrenérgicas y que durante el desarrollo, por un proceso mediado por su proyección a los órganos blanco, se diferencian a neuronas colinérgicas (Ernsberger and Roher, 1999; Asmus et al, 2000).

Encontramos que estas neuronas positivas a ChAT están inervadas de manera muy abundante por fibras IRChAT así como por fibras IRMet-ENK, lo que sugiere una importante modulación inhibitoria ejercida por la Met-ENK sobre ellas.

También hemos encontrado, en pocos casos, neuronas ganglionares que son simultáneamente positivas a ChAT y a TH, lo cual ha sido observado con anterioridad (Lindh and Hökfelt, 1990; Sann et al, 1995). La presencia de estas dos enzimas indica la posibilidad de que estas neuronas pudieran sintetizar tanto acetilcolina como noradrenalina simultáneamente, sin embargo no se sabe si efectivamente se sintetizan

y se liberan ambos transmisores al mismo tiempo o bajo qué circunstancias se produce este fenómeno.

Nosotros encontramos un incremento de estas neuronas después de denervar el ganglio por siete días, este dato pudiera indicar que la falta de actividad presináptica desencadena algún tipo de señal que produzca la síntesis de ambos transmisores similar a la que se ha reportado en los casos de la inervación de los órganos blanco (Schotzinger and Landis, 1988).

Entre los diferentes péptidos encontrados en los ganglios simpáticos (Gibbins, 1992; Elfvin et al, 1993; Benarroch, 1994; Morales et al, 1995; Klimaschewki et al, 1996; Lundberg, 1996), la NT y la Met-ENK se han detectado en el ganglio estelar y cervical superior de varias especies (Bachoo et al, 1987; Darvesh et al, 1987; Heym et al, 1993; Morales et al, 1993), nosotros encontramos que las fibras y botones que contienen a estos péptidos corren a lo largo del neuropilo entre las somas inmunonegativas a ambos péptidos de las neuronas ganglionares confirmando los estudios anteriormente mencionados. Sólo en el caso de Met-ENK y de manera muy escasa, detectamos somas neuronales IRMet-ENK los cuales también son positivos a TH, como ha sido reportado en el ganglio estelar de la rata (Morales et al, 1995).

Observamos también que el número de fibras inmunoreactivas a NT es claramente mayor que el de las fibras que contienen Met-ENK como ha sido descrito en otros estudios en el ganglio estelar del gato (Heym et al, 1984), esto sugiere una mayor modulación de tipo facilitatoria sobre la transmisión ganglionar.

El origen preganglionar de las fibras inmunoreactivas a los tres transmisores estudiados se confirmó denervando el ganglio siete días antes de la detección, lo cual tuvo como resultado la desaparición casi total de la marca producida por la

degeneración de los axones preganglionares; además, observamos un incremento en el número de células IRChAT e IRMet-ENK y la aparición de neuronas IRNT, esta IR producida por la denervación se encontró en coexistencia o no con la IRTH.

Datos similares han sido reportados para los péptidos somatostatina y sustancia P después de la denervación, sugiriendo que la inervación colinérgica puede inhibir de alguna manera la síntesis de péptidos (Kessler et al, 1981; Kessler and Black, 1982). Otra alternativa sería que estas neuronas manden sus axones a través de los nervios preganglionares y que inerven blancos localizados en la médula espinal y, al axotomizar estas células, se induciría una regulación positiva de estos péptidos por la interrupción de su transporte axónico anterógrado, se necesitarían estudios de inmunomarcaje y marcaje retrógrado simultáneamente para confirmar o descartar esta posibilidad.

La NT y la Met-ENK tienen un efecto modulador opuesto sobre la sinapsis ganglionar. La acción facilitadora de la NT sobre esta sinapsis es expresada por un aumento en la frecuencia cardíaca después de una inyección intra-arterial en el ganglio estelar del gato (Bachoo and Polosa, 1988), el efecto contrario (inhibidor, disminución de la frecuencia cardíaca) de la Met-ENK también se observa después de una inyección intra arterial del péptido. La función antagónica de la NT y Met-ENK, hace relevante la exploración de los posibles mecanismos por los cuales se establece un balance adecuado entre la facilitación-inhibición.

Una posibilidad es que los dos péptidos coexistan en los mismos botones y sean liberados diferencialmente de acuerdo a los distintos requerimientos de modulación. Otra alternativa es que ambos péptidos se encuentren almacenados en fibras y botones diferentes, pero que converjan en la misma neurona; para examinar estas dos

posibilidades se realizaron experimentos con doble marcaje inmunofluorescente simultáneo contra NT y Met-ENK y se analizaron con microscopía confocal.

Encontramos que la mayoría de los botones preganglionares almacenan a cada uno de los péptidos por separado y, sólo en muy pocos casos ambos péptidos coexisten en los mismos botones, las fibras positivas a los dos péptidos corren muy juntas y hasta paralelas a lo largo del neuropilo y convergen sobre las mismas neuronas, aunque también se encontraron neuronas asociadas a fibras que contienen un solo péptido. Esto implica que hay subpoblaciones de fibras preganglionares químicamente diferentes que inervan a la misma neurona.

Estudios de inmunohistoquímica ultraestructural han confirmado que algunas neuronas ganglionares lumbares de cobayo reciben inervación de por lo menos dos clases de fibras preganglionares químicamente distintas (fibras que contienen sustancia P y Met-ENK-Arg-Gly-Leu) (Murphy et al, 1998). La diversificación morfológica de la NT y Met-ENK ha sido sugerida con anterioridad por Krukoff et al (1985) quienes encontraron poblaciones de neuronas preganglionares inmunoreactivas a NT o Met-ENK en niveles diferentes de la médula espinal.

Una vez establecida la escasa colocalización de NT y Met-ENK, analizamos la posibilidad de que cada uno de los péptidos pudiera tener un patrón distintivo de distribución regional. Los datos del procesamiento de imágenes sobre el análisis de la distribución de las terminales, IRNT e IRMet-ENK, muestran un patrón distinto y de cierta manera complementaria para cada uno de los péptidos, esto parece estar de acuerdo a sus efectos moduladores opuestos.

De acuerdo a este patrón de distribución y al de las neuronas que proyectan hacia los diferentes órganos blanco del ganglio (Carbó et al, 1997), habría cuatro

poblaciones de neuronas distintas: 1) las neuronas de la región ventromedial (área D) que regulan la función cardíaca son el blanco principal de terminales encefalinérgicas, sin embargo, también pueden recibir inervación de NT, 2) por el contrario, las neuronas que por el nervio vertebral proyectan hacia los vasos de las extremidades superiores (regiones dorsomedial: B y craneal: C) reciben principalmente inervación neurotensinérgica, 3) una población menos común, principalmente en la región caudal (región A), la cual incluye neuronas cardíacas y vertebrales, que reciben inervación de ambos péptidos, y 4) neuronas principalmente de la región caudal que reciben inervación neurotensinérgica, posiblemente manden sus axones por la cadena simpática hacia blancos centrales.

Los antecedentes en la literatura junto con nuestros resultados, sugieren que el balance modulador entre facilitación e inhibición de la transmisión sináptica ganglionar se establece básicamente por una inervación de tipo complementaria más que a través de la coexistencia de ambos péptidos. También es posible sugerir que en el ganglio estelar existen núcleos independientes de neuronas que reciban inervación selectiva de alguno de los péptidos y que pudieran participar en funciones autonómicas distintas, contrariamente a lo que tradicionalmente se ha propuesto en relación con la función de los ganglios autonómicos. Estudios morfológicos más detallados sobre la localización de estos posibles núcleos con funciones autonómicas distintas son necesarios para ahondar en esta cuestión.

Con respecto a la liberación de los péptidos, no sólo confirmamos que la NT puede liberarse con frecuencias de estimulación alta (20 ó > Hz) y que la prolongación del estímulo por varios minutos, da lugar a una reducción de los almacenes preganglionares del péptido (Maher et al, 1994), sino que por primera vez encontramos

que la NT, al igual que los neurotransmisores clásicos, puede ser liberada con frecuencias incluidas en los rangos de los tonos fisiológicos (2-8 Hz) como 5 Hz. El mantener el mismo número de pulsos (48,000), sugiere que más que la frecuencia, pudiera ser el tiempo de activación lo que promueve la liberación de los péptidos; estudios de bajas frecuencias con un menor número de pulsos podrían aclarar este punto.

Con 40 y 5 Hz encontramos que en las preparaciones donde se usó el antagonista del receptor de NT, SR4869, se presentó una tendencia aunque estadísticamente no significativa, a liberar menos NT en relación con los experimentos en donde no se usó el antagonista. El hecho de encontrar menos liberación en las preparaciones en las cuales se usó el antagonista, podría apoyar la posibilidad de la existencia de un receptor presináptico, (el cual sólo se ha detectado con inmunofluorescencia en cultivos de células hipotalámicas de embriones de rata, Bachelet et al, 1997), en las neuronas preganglionares simpáticas que pudiera estar involucrado en la dinámica de liberación de la NT, promoviendo su liberación, y que el antagonista SR48692 pudiera tener un efecto de bloqueo sobre esta función; estudios más detallados son necesarios para aclarar este punto.

Una vez liberada la NT, observamos que las neuronas principales del ganglio se convirtieron en el nuevo sitio de la inmunoreactividad a NT, lo cual, de acuerdo a la literatura, correspondería a la internalización del péptido. A diferencia de los estudios que hasta ahora se han realizado sobre la internalización de NT usando NT exógena (Beaudet et al, 1994; Faure et al, 1995; Bachoo et al, 1996), nosotros encontramos el mismo fenómeno pero con la NT endógena liberada de las terminales preganglionares por estimulación eléctrica.

Este proceso de internalización también resultó ser mediado por el acoplamiento de la NT a su receptor lo que demostramos con el uso del antagonista al receptor de NT, SR48692, en estos experimentos se disminuyó claramente la inmunoreactividad a NT de los somas neuronales. Las diferencias encontradas en la internalización de la NT en las preparaciones estimuladas con 40 y 5 Hz, podrían ser sólo deberse a la cantidad diferente de NT liberada, disponible para internalizarse.

La internalización de NT fue más evidente en la región cercana a la salida del nervio vertebral que coincidentemente corresponde a la zona donde hemos encontrado mayor IRNT, lo que sugiere que las neuronas internalizan el péptido de acuerdo a la cantidad de inervación que reciben, este punto también se puede apoyar con los resultados que obtuvimos con respecto a la cantidad de NT internalizada (35% menos) cuando la estimulación se da a frecuencias bajas como 5 Hz.

Cuando los experimentos de 40 Hz se analizaron con microscopía confocal, encontramos que la inmunoreactividad en las células se observa en forma de gránulos intensamente fluorescentes de distintos tamaños (0.5-2 μm) con dos patrones de distribución: una acumulación de gránulos en un polo del pericarión de la célula y otra alrededor del núcleo. Esto pudiera deberse a una distribución particular a lo largo de la membrana celular de los receptores de NT; de manera que el polo del pericarión con acumulación de gránulos esté asociado a una zona membranal (somática o dendrítica) con abundante presencia de receptores.

El proceso de internalización de la NT exógena dependiente de tiempo (Faure et al, 1995) también parece ser válido para la internalización del péptido endógeno. En nuestros resultados hemos encontrado que se requieren varios minutos después de

finalizar la estimulación para detectar claramente la inmunoreactividad, mientras que a los 120 min se observó la mayor internalización, con un desvanecimiento de ésta a las 24 hs.

Estos datos coincidirían con el reporte sobre la dinámica de internalización que se ha descrito en otras regiones del sistema nervioso en el sentido de que hay un desplazamiento intracelular centripeto hacia la región perinuclear, el cual se ha propuesto que ocurre dentro de los primeros 30-60 min (Faure et al, 1995). La internalización de NT es acompañada de un decremento en los receptores de la superficie celular (Hermans et al, 1994), este fenómeno ha sido propuesto como un mecanismo involucrado en la degradación del ligando y la remoción de los receptores (Hermans et al, 1997) o implicado en los efectos a largo plazo como regulación genómica (Burgevin et al, 1992).

CONCLUSIONES

1. De los transmisores explorados en el ganglio estelar del gato, la acetilcolina, detectada a través de la inmunorreactividad a la enzima ChAT, y los péptidos NT y Met-ENK, encontramos un almacenamiento de cada uno de ellos en distintos botones preganglionares, con casi nula coexistencia. Las fibras y botones preganglionares que contienen a cada transmisor mostraron distribuciones topográficas diferentes; como era de esperarse, la ChAT mostró una distribución homogénea a lo largo del tejido ganglionar, mientras que los péptidos tienen una inervación preferencial a regiones específicas del ganglio. Estos datos sugieren que el balance de modulación dual de facilitación-inhibición se logra por la distribución topográfica diferente y complementaria

de los botones que contienen a cada modulador, más que por la presencia de botones que coalmacenan y coliberan a los moduladores.

2. Además de su presencia en botones preganglionares, la ChAT y la Met-ENK se encontraron en unos cuantos somas de neuronas ganglionares principales (TH positivas y TH negativas). Esta presencia somática se encontró en un mayor número de neuronas después de la denervación. La NT, que en condiciones control no se detectó en somas, se volvió detectable después de la denervación. Estos datos sugieren la posibilidad de que la innervación colinérgica normal pudiera inhibir la síntesis de mediadores en las neuronas ganglionares o que se trate de neuronas que mandan sus axones por los nervios preganglionares.

3. La NT puede ser liberada con un amplio margen de frecuencias de estimulación eléctrica preganglionar, incluidas las de los tonos fisiológicos. Por otro lado encontramos que este péptido cuando se libera endógenamente, se internaliza en sus células blanco a través de un proceso mediado por su receptor, dependiente de tiempo y con un desplazamiento centrípeto intracelular. Estos datos sugieren que la internalización de la NT pudiera ser un paso dentro de la dinámica de su señalización celular.

4. Nuestros datos en conjunto apoyan la noción de que los ganglios autonómicos, lejos de ser una mera estación de relevo de la señal motora eferente constituyen verdaderos centros de procesamiento que incluyen diferentes códigos químicos de transmisión, así como patrones topográficos específicos, a manera de núcleos morfológica y funcionalmente independientes. Esta capacidad del ganglio facilitaría la integración y regulación periférica, sin participación central, de varias funciones autonómicas como serían reflejos víscero-visceral.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Alonso, A., Faure, M.P., and Beaudet, A. Neurotensin promotes rhythmic bursting behavior and is internalized in basal forebrain cholinergic neurons. J. Neurosc. 14: 5778-5792. 1994.
- Asmus, S., Parsons, S., and Landis, S. Developmental changes in the transmitter properties of sympathetic neurons that innervate the periosteum. J. Neurosc. 20: 1495-1504. 2000.
- Bachelet, C-M., Scarcériaux, V., Rostené, W., and Pélaprat, D. Evidence of neurotensin autoreceptors and relationship of neurotensin and its receptors with tyrosine hydroxylase-positive neurons in rat primary hypothalamic cultures. Eur. J Neurosc. 9: 1483-1487. 1997.
- Bachoo, M., Ciriello, J., and Polosa, C. Effect of preganglionic stimulation on neuropeptide-like immunoreactivity in the stellate ganglion of the cat. Brain Res. 400: 377-382. 1987.
- Bachoo, M. and Polosa, C. Cardioacceleration produced by close intra-arterial injection of neurotensin into the stellate ganglion of the cat. Can. J. Physiol Pharmac 66: 408-412. 1988.
- Bachoo, M., Faure, M. and Beaudet, A. Confocal imagin shows that neurotensin (NT) internalization in cat stellate ganglion is dendritic and influenced by targed-derived and transynaptic factors. Soc. for Neurosc. Abs. 22: 1298. 1996.
- Beaudet, A., Mazella, J., Nouel, D., Chabry, J., Castel, N., Laduron, P., Kitabgi, P., and Faure, M.P. Internalization and intracellular mobilization of neurotensin in neuronal cells. Bioch. Pharmacol. 47: 43-52. 1994.
- Benarroch, E. Neuropeptides in sympathetic system: presence, plasticity, modulation and implications. Ann. Neuro. 36: 6-13. 1994..
- Burgevin, M.C., Castel, M.N., Quarteronet, D., Chevet, T., and Laduron, P.M. Neurotensin increases tyrosine hydroxylase messenger RNA-positive neurons in substantia nigra after retrograde axonal transport. Neuroscience. 49: 627-633. 1992.
- Burnstock, G., Campbell, G., Bennett, M., and Holman, M.E. Inervation of the guinea-pig taenia coli: are there intrinsic inhibitory nerves which are distinct from sympathetic nerves?. Int. J. Neuropharmacol. 3: 163-166. 1964.
- Cahill, CM., Lee, M-C., Vincent, JP. and Beaudet, A. Increase in delta opioid receptors internalization following chronic morphine treatment. Soc. For Neurosc. Abs. 25: 2215. 1999.

Chang, K.J., and Cuatrecasas, P. Heterogeneity and properties of opiate receptors. FASEB. 40 (13): 2729-2734. 1981.

Carbó, R., Zetina, M.E., Gorkidi, G., and Morales, M.A. Topographic relationship of neurotensin-containing axon terminals with cardiac and noncardiac principal ganglion cells in the stellate ganglia of the cat. Synapse. 25: 277-284. 1997.

Caverson, M. N.; Bachoo, M.; Ciriello J and Polosa, C. Effect of preganglionic stimulation of chronic decentralization on neurotensin-like immunoreactivity in sympathetic ganglia of the cat. Brain Res. 482: 365-370. 1989.

Chabry, J; Labbé-Jullière, C; Gully, D; Kitabgi, P; Vincent, J-P and Mazella J. Stable expression of the cloned rat brain neurotensin receptor into fibroblasts: binding properties, photoaffinity labeling, transduction mechanisms and internalization. J. of Neuroch. 63 No 1: 19-27. 1994

Dale, H. Pharmacology and nerve endings. Proc. R. Soc. Med. 28: 319-332. 1935.

Darvesh, S., Nance, D.M., Hopkins, D.A., and Armour, J.A. Distribution of neuropeptide-like immunoreactivity in intact and chronically decentralized middle cervical and stellate ganglia of dogs. J. Aut. Nerv. Sys. 21: 167-180. 1987.

Eccles, R.M. and Libet, B. Origin and blockade of the synaptic responses of curarized sympathetic ganglia. J. Physiol 157: 484-503. 1961.

Elfvin, L., Lindh, B., and Hökfelt, T. The chemical neuroanatomy of sympathetic ganglia. Annu. Rev Neurosc. 16: 471-507. 1993.

Elfvin, L.G., and Dalsgaard, C.J. Retrograde axonal transport of horseradish peroxidase in afferent fibers of the inferior mesenteric ganglion of the guinea-pig. Identification of the cells of origin in dorsal root ganglia. Brain Res. 126: 149-153. 1977.

Eränkö, O. and Eränkö, L. Small intensely fluorescent granulo-containing cells in the sympathetic ganglion of the rat. Prog. Brain. Res. 34: 39-51. 1971

Ernsberg, U., and Roher, H. Development of the cholinergic neurotransmitter phenotype in postganglionic sympathetic neurons. Cell. Tis. Res. 297: 339-361. 1999.

Faure, M.P., Alonso, A., Nouel, D., Gaudriault, G., Dennis, M., Vincent, J.P., and Beaudet, A. Somatodendritic internalization and perinuclear targeting of neurotensin in the mammalian brain. J. of Neurosc. 15: 4140-4147. 1995.

Gibbins, I.L. Vasoconstrictor, vasodilator and pilomotor pathways in sympathetic ganglia of guinea-pigs. Neuroscience 47: 657-672. 1992.

Gully, D; Canton, M; Boigegrán, R; Jeanjean, F; Molimard, J; Poncelet, M; Geudet, CH; Heaulme, M; Leyris, R; Brouard, A; Pelaprat, D; Labbé-Jullié, C; Mazella, J; Soubrié, PH; Mafrand, J_P; Rostené, W; Kitabgi, P and Le Fur, G. Biochemical and pharmacological profile of a potent and selective nonpeptide antagonist of the neurotensin receptor. Proc. Nac. Acad. Sci. 90: 65-69. 1993.

Hermans, E; Octave, J and Maloteaux, J.M. Receptor mediated internalization of neurotensin in transfected Chinese hamster ovary cells. Bioch. Pharmacol. 47: 89-91. 1994.

Hermans, E; Vanisberg, M.A; Geurts, M and Maloteaux, J.M. Down-regulation of neurotensin receptors after ligand-induced internalization in rat primary cultured neurons. Neurochem. Int. 31: 291-299. 1997.

Heym, C., Reinecke, M., Weihe, E., and Forssmann, W.G. Dopamine- β -hydroxylase-, neurotensin-, substance P-, vasoactive intestinal polypeptide- and enkephalin-immunohistochemistry of paravertebral and prevertebral ganglia in the cat. Cell. Tis. Res. 235: 411-418. 1984.

Heym, C., Liu, N., Gleich, A., Oberst, P., and Kummer, W. Immunohistochemical evidence for different pathways immunoreactive to substance P and calcitonin gene-related peptide (CGRP) in the guinea-pig stellate ganglion. Cell. Tis. Res. 272: 563-574. 1993.

Hewlitt, W.A., Akil, H., and Barchas, J.D. Differential interactions of Dynorphin (1-13), β -Endorphin, and Enkephalin-related peptides at μ and δ sites in different brain regions. In Advances in endogenous and exogenous opioids. By Takagi, H., and Simon, E. Elsevier Biomedical Press. p.p. 36-38. 19081.

Hökfelt, T., Holets, V.R., Stines, W., Melander, T., Schalling, M., Schultzberg, M., Freedman, J., Björklund, H., Olson, L., Lindh, B., Elfvin, L.G., Lundberg, J.M., Lindgren, J.A., Samuelsson, B., Pernow, B., Terenius, L., Post, C., Everitt, B., and Goldstein, M. Coexistence of neuronal messengers-an overview. Prog. In Brain Res. 68: 33-70. 1986.

Hökfelt, T; Elfvin, L; Elde, R; Schultzberg, M; Goldstein, M. and Luft, R. Occurrence of somatostatin-like immunoreactivity in some peripheral sympathetic noradrenergic neurons. Proc. Nat. Acad. Sci 74: 3587-3591. 1977.

Jiménez, B., Mora-Valladares, E., Zetina, M.E., and Morales M.A. Occurrence, co-occurrence and topographic distribution of choline acetyltransferase, met-enkephalin and neurotensin in the stellate ganglion of the cat. Synapse. 143: 163-174. 2002.

Keith, D., Anton, B., Murray, S., Zaki, P., Chu, P., Lissin, D., Montelliet-Agius, G., Stewart, PH., Evans, CH., and Zastrow, M. μ -Opioid receptor internalization: opiate drugs have differential effects on a conserved endocytic mechanism in vitro and in the mammalian brain. Molec. Pharmacol. 53: 377-384. 1998.

ESTA TESIS NO SALE
DE LA BIBLIOTECA

- Kessler, J.A., Adler, J., Bohn, M., and Black, I.B. Substance P in sympathetic neurons: regulation by impulse activity. Science. 214: 335-336. 1981.
- Kessler, J.A., and Black, I.B. Regulation of substance P in adult rat sympathetic ganglia. Brain Res. 234: 182-187. 1982.
- Kitabgi, P., Rostené, W., Dussaillant, M., Schotte, A., Laduron, P.M., and Vincent, J.P. Two populations of neurotensin binding sites in murine brain: discrimination by the antihistamine levocabastine reveals markedly different radioautographic distribution. Eur. J. of Pharmacol. 140: 285-293. 1987.
- Klimaschewski, L; Kummer, W and Heym, CH. Localization, regulation and functions of neurotransmitters and neuromodulators in cervical sympathetic ganglia. Microsc. Rese. And Tech. 35 : 44-68.1996.
- Krukoff, T.I; Ciriello, J and Calaresu. F.R. Segmental distribution of peptide-like immunoreactivity in cell bodies of the thoracolumbar sympathetic nuclei of the cat. J. Comp. Neurology. 240: 90-102. 1985.
- Kupfermann, Y. Functional studies of cotransmission. Physiol. Rev. 71: 683-721. 1991.
- Langley, J.N. The autonomic nervous system. Heffer & Sons, Cambridge. 1921.
- Lindh, B., Staines, W., Hökfelt, t., Terenius, L., and Svaterra, P.M. Immunohistochemical demonstration of choline acetyltransferase-immunoreactive preganglionic nerve fibers in guinea pig autonomic ganglia. Proc. Natl. Acad. Sci 83: 5316-5320. 1986.
- Lindh, B., Hökfelt, T., and Elfvin, L.G. Distribution and origin of peptide-containing nerve fibers in the celiac superior mesenteric ganglion of the Guinea-pig. Neuroscience. 26: 1037-1071. 1988.
- Lindh, B., and Hökfelt, T. Structural and functional aspects of acetylcholine peptide coexistence in the autonomic nervous system. Prog. Brain. Res. 84: 175-574. 1990.
- Lundberg, J.M. Pharmacology of co-transmission in the autonomic nervous system: integrative aspects of amines, neuropeptides, adenosine triphosphate, amino acids and nitric oxide. Pharmacol. Rev. 48 No 1: 113-178. 1996.
- Maher, E., Bachoo, M., Cernacek, P., and Polosa, C. Dynamics of neurotensin stores in the stellate ganglion of the cat. Brain Res. 562: 258-264. 1991.
- Maher, E., Bachoo, M., and Polosa, C. Role of neuron soma firing in the restoration of neurotensin store in sympathetic preganglionic neuron terminals after stimulus-evoked depletion. Brain Res. 640: 126-130. 1994.

- Maier, E., Bachoo, M., and Polosa, C.** In vitro and in vivo evidence of neurotensin release from preganglionic axon terminals in the stellate ganglion of the cat. Brain Res. **640**: 131-135. 1994.
- Mazella, J., Botto, J.M., Guillemare, E., Coppola, T., Sarret, P.H., and Vincent, J.P.** Structure, functional expression, and cerebral localization of the levocavastine-sensitive neurotensin/neuromedin N receptor from mouse brain. J. Neurosci. **16**: 5613-5620. 1996.
- McLachlan, E.** Autonomic Ganglia. USA. Harwood Academic Publishers. p.p. 13-26. 1995.
- Morales, M.A., Bachoo, M., Beaudet, A., Collier, B., and Polosa, C.** Ultrastructural localization of neurotensin immunoreactivity in the stellate ganglion of the cat. J. Neurocytol. **22**: 1017-1021. 1993.
- Morales, M.A., Holmberg, K., Xu, Z., Cozzari, C., Hartman, B., Emson, P., Goldstein, M., Elfvin, L., and Hökfelt, T.** Localization of choline acetyltransferase in rat peripheral sympathetic neurons and its coexistence with nitric oxide synthase and neuropeptides. Proc. Natl. Acad. Sci. **92**: 11819-11823. 1995.
- Murphy, S; Matthew, S; Rodgers, H; Lituri, D. and Gibbins, I.L.** Synaptic organisation of neuropeptide-containing preganglionic butons in lumbar sympathetic ganglia of Guinea pigs. J. Comp. Neur. **398**: 551-567. 1998.
- Nozdrachev, A., Jiménez B., Morales, M.A., and Fateev, M.** Neuronal organization and cell interactions of the cat stellate ganglion. Aut. Neurosc. 2002, en prensa.
- Oldfield, B.J.,and McLachlan, E.M.** Localization of sensory neurons traversing the stellate ganglion of the cat. J. Comp. Neurol. **182**: 915-922. 1978.
- Prosdocimi, M; Finesso, M and Gorio, A.** Enkephalin modulation of neural transmission in the cat stellate ganglion: pharmacological actions of exogenous opiates. J. Auton. Nerv. Syst. **17**: 217-230. 1986.
- Quigg, M., Elfvin, L.G. and Aldskogius, H.** Anterograde transynaptic transport of WGA_HRP from spinal afferents to postganglionic sympathetic cells of stellate ganglion of the guinea pig. Brain Res. **518**: 173-178. 1990.
- Rioli, V; Kato, A; Portaro, F; Cury, G; Kaat, K; Vincent, B; Checler, F; Camargo, A; Glucksman, M; Roberts, J; Hirose, S and Ferro, M.** Neuropeptide specificity and inhibition of recombinant isoforms of the endopeptidase 3.4.24.16 family: comparison with the related recombinant endopeptidase 3.4.24.15. Bioch. And Bioph. Res. Comm. **250**: 5-11. 1998.

Sann, H., McCarthy, P.W., Shermann, M., Jurzak, M., Poethke, R., and Pierau, KP. Choline acetyltransferase-immunoreactive neurons in a prevertebral sympathetic ganglion of the inferior mesenteric ganglion. J. Aut. Nerv. Sys. 54: 195-205. 1995.

Schotzinger, R.J., and Landis, S.C. Cholinergic phenotype developed by noradrenergic sympathetic neurons after innervation of a novel cholinergic target in vivo. Nature. 335: 637-639. 1988.

Shi, W.X., and Bunney, B. Actions of neurotensin: a review of the electrophysiological studies. In The neurobiology of neurotensin by Kitabgi, P., and Nemeroff, C.H. N. Y. Acad. Of Sci. p.p. 129-145. 1992.

Sjöqvist, F. The correlation between the occurrence and localization of acetylcholinesterase-rich cell bodies in the stellate ganglia and in outflow of cholinergic sweat secretory fibers to the fore paw of the cat. Acta Physiol. Scand. 57: 339-351. 1963.

Stemini, C., Spann, M., Anton, B., Keith, D.E., Bunnet, N., Von Zastrow, M., Evans, CH., and Brecha, N. Agonist-selective endocytosis of μ opioid receptor by neurons in vivo. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 93: 9241-9246. 1996.

Vandenbulcke, F; Nouel, D; Vincent, J-P and Beaudet, A. Differential intracellular trafficking of neurotensin and its receptor in COS-7 transfected cells. Soc. Neurosc. Abs 24: 1592. 1998.

Vincent, J_P. Neurotensin receptors: binding properties, transduction mechanisms and purification. In The neurobiology of Neurotensin. By Kitabgi, P and Nemeroff, CH. USA. New York Academy of Science. P.p. 90-100. 1992.

Vincent, B; Beaudet, A; Dauch, P; Vincent, J-P and Checler, F. Distinct properties of neuronal and astrocytic endopeptidase 3.4.24.16: a study of differentiation, subcellular distribution and secretion processes. J. Neurosc. 16: 5049-5059. 1996.

Waters, S., Konkoi, CH., and Davis, T. Neuropeptide metabolism on intact regional brain slices: effect of dopaminergic agents on substance P, cholecystokinin and met-enkephalin degradation. J. Pharmacol. Exper. Therap. 274: 783-789. 1995.

Zetina M.E., Jiménez, B., Díaz-Luna, F., Mora-Valladares, E., and Morales, M.A. Release-depletion and receptor-mediated neuronal internalization of endogenous neurotensin in stellate ganglion of the cat. Neuroscience. 92: 655-664. 1999.

Zhang, C., Bachoo, M., and Polosa, C. Use-dependent fade and two-rate recovery of a naloxone-sensitive inhibition in the cat superior cervical ganglion. Brain. Res. 611: 279-285. 1993.

Zhang, C., Bachoo, M., Morales, M.A., Collier, B., and Polosa, C. The site of inhibitory action of endogenous opioids in the superior cervical ganglion of the cat. Brain Res. 683: 59-64. 1995.