

03086

L-A

24



Universidad Nacional Autónoma de México

COLEGIO DE CIENCIAS Y HUMANIDADES

UNIDAD ACADÉMICA DE LOS CICLOS
PROFESIONAL Y POSGRADO

MODULACION DE LA POTENCIACION ALARGO PLAZO (LTP) EN
EL GANGLIO CERVICAL SUPERIOR *in vivo* DEL GATO

T E S I S

Que para obtener el Grado de

DOCTOR EN CIENCIAS

(FISIOLOGICAS)

p r e s e n t a :

MIGUEL ANGEL MORALES MENDOZA

INSTITUTO DE INVESTIGACIONES
BIOMEDICAS

México, D.F.

1989





Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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.

INDICE

PREFACIO	I
RESUMEN	IV
ABSTRACT	V
INTRODUCCION	1
METODO	4
Animales	4
Experimentos de electrofisiología	4
Preparación <i>in situ</i>	4
Protocolo	6
Pulsos de prueba	6
Grupos experimentales	6
Telonización	9
Estimación de las respuestas	9
Registros del tronco simpático	9
Niveles de bloqueo	10
Secuencia de experimentos	10
Ajuste de funciones a los datos experimentales	11
Experimentos de ultraestructura	11
Técnica de perfusión y fijación <i>in situ</i>	11
Parámetros sinápticos	14
Grupos experimentales	14
RESULTADOS	16
Potenciación retardada (PR) en el ganglio <i>in vivo</i>	16
Variación en el curso temporal de la PR	18
Tiempo de aparición de la cima	21
Magnitud de la potenciación	23
Efectos telánicos	25
Diferencias en la ultraestructura de las sinapsis	29
DISCUSION	33
Estudios de electrofisiología	33
Significado de los diferentes cursos temporales postrén e intratrén	33
Curso postrén	33
Cambios intratrén	37
Estudios de ultraestructura	38
LTP proceso rígido vs LTP proceso modulado	40

Relevancia fisiológica	40
APENDICE I	42
APENDICE II	46
Modelo de los mecanismos de PPT y LTP ganglionar	46
Sinapsis ganglionar	46
El modelo	48
Elementos del modelo	48
Mecanismos de la terminación	51
Cinética lineal en las terminaciones inhibidas	51
Terminación desinhibida y efecto de bifurcación	53
Modelo y PR ganglionar	55
REFERENCIAS	58

PREFACIO

El estudio de la plasticidad del Sistema Nervioso (SN) constituye, a mi entender, uno de los problemas fundamentales de la Ciencia en el siglo actual. Guiado por este pensamiento he dedicado los últimos ocho años de mi trabajo de investigación a tratar de esclarecer las características de esta singular propiedad del SN.

La manera como he abordado el estudio de la plasticidad del SN es mediante el análisis de procesos relativamente simples de plasticidad, como los fenómenos de potenciación neuronal tipo Potenciación Postetélica (PPT) y Potenciación a largo plazo (LTP). Toda la investigación la desarrollé en el Laboratorio de Biofísica Experimental de este Instituto bajo la pertinente y cuidadosa asesoría del Dr. Francisco Alonso de Florida.

La preparación experimental sobre la cual analicé estos fenómenos de facilitación es el ganglio simpático cervical superior *in situ* del gato. En el laboratorio del Dr. de Florida se realiza rutinariamente desde la década de los sesenta, una técnica de estimulación y registro de este ganglio autonómico. Esta confiable y elegante técnica permite analizar integralmente los cambios responsables del desarrollo de fenómenos plásticos, desde el análisis electrofisiológico de las respuestas globales del ganglio hasta la exploración de la ultraestructura de las sinapsis ganglionares.

En un principio la idea general de la investigación era determinar los mecanismos sinápticos responsables de la plasticidad en el ganglio autonómico. Si bien los estudios se completaron en fenómenos relativamente simples de plasticidad, la intención inicial incluía también inducir cambios de muy largo plazo (en la escala de semanas) en la fisiología del ganglio. Desafortunadamente, esta parte fundamental de la investigación no se logró redondear a nuestra entera satisfacción, debido a problemas técnicos surgidos durante la implementación de la estimulación eléctrica crónica del ganglio, mismos que nos obligaron a suspender temporalmente estos experimentos. En mi Tesis de Maestría reporté los datos preliminares que encontramos, lo que a reserva de su definitiva confirmación, apuntan hacia cambios muy notorios en el ganglio autonómico como fue un aumento en la excitabilidad y un destacable incremento en el tamaño de los ganglios estimulados.

En los primeros experimentos se estudió la PPT y el efecto de la descentralización sobre su desarrollo, datos que también comuniqué en mi Tesis de Maestría y en una reciente publicación del Boletín de Estudios Médicos y Biológicos. Dentro de esos primeros estudios, el análisis se extendió de la PPT hasta otro fenómeno facilitatorio de mayor duración, conocido como potenciación a largo plazo o LTP, dada su semejanza al fenómeno descrito en hipocampo.

La serie experimental, más de 50 preparaciones que formaron el estudio electrofisiológico, la desarrollé con la valiosa y entusiasta colaboración del Med. Cirj. Sergio Soza Bulnes, a quien agradezco sinceramente su determinante contribución. Ayudándonos a los dos siempre fue oportuna la participación de Irma Rodríguez. Para el análisis adecuado de la gran cantidad de datos obtenidos, conte con la eficiente asesoría matemática y de computación de mi hermano Luis B. Morales

Como se menciona en la Discusión de esta Tesis, el cauce de esta investigación fue influido por la notoria controversia que encontramos en la literatura correspondiente al tema. De manera primordial, conforman esta controversia los datos contradictorios del grupo de Briggs y col, que también se discuten en la Tesis.

Ya terminada la serie electrofisiológica, para robustecer nuestras aportaciones, se decidió complementar el trabajo con un análisis ultraestructural de la sinapsis ganglionar durante el desarrollo de la PPT y LTP. Esta parte del trabajo la realice con Microscopía Electrónica bajo la formativa asesoría del Dr. Horacio Merchant.

Como menciono en la Introducción, esta Tesis cuenta con dos apéndices. En el segundo de ellos describo de manera cualitativa un modelo sobre PPT y LTP ganglionar que hemos desarrollado en el laboratorio junto con la indispensable e inteligente participación del Dr. Antonmaria Minzoni a quien agradezco el interés que siempre demostró no sólo en la Tesis y en el modelo, sino particularmente en esclarecer, durante nuestras discusiones, todas las dudas que me inquietaban.

Un párrafo aparte es para agradecer a toda mi familia , particularmente a mi Madre y a mis hermanos por la paciencia y el constante interés que sobre mi desarrollo personal y profesional siempre me manifestaron.

Finalmente quiero agradecer a la Fís. Ana Luisa Guzman el hacer entendibles y coherentes las ideas que comunico en esta Tesis; a mis sinodales Dr. Francisco Alonso de Florida, Dr. Horacio Merchant, Dr. Enrique Hong, Dr. Emilio Kabela, Dr. Manuel Alcaraz, Dr. Alejandro Bayon y Dr. Antonmaria Minzoni, su vigorosa crítica al trabajo y su desinteresada participación en el examen de grado; y a mis compañeros del Laboratorio: Irma Rodríguez, Maria de la Luz Zárate, Gabriela Sánchez-Mejorada y Gustavo Gallegos su apoyo y confianza.

Miguel A. Morales Mendoza.

México D.F. Agosto de 1989

RESUMEN

En esta tesis se estudia en el ganglio simpático cervical superior *in situ* del galo, el fenómeno de potenciación retardada (PR) con sus dos componentes, el temprano y breve, potenciación posttétrica (PPT) y el tardío y prolongado, potenciación a largo plazo (LTP). La investigación se abordó con dos procedimientos experimentales, estudio de electrofisiología y estudio de ultraestructura. En el análisis electrofisiológico se exploró la PR obtenida por la aplicación de un tren tetanizante (24 Hz, 30 s), bajo cuatro diferentes condiciones experimentales: estimulación supramáxima (SPM), estimulación submáxima (SBM), estimulación supramáxima aplicada al tronco preganglionar parcialmente seccionado (TRN) y estimulación supramáxima en preparaciones con bloqueo parcial por hexametonio (BLK). Se estudió tanto el curso temporal postrén de la PR como el del fenómeno de potenciación-depresión intratrén. En ambos casos, el resultado principal fue la variación en el perfil de los cursos temporales conforme a la condición experimental de tetanización. Todos los resultados pueden conjuntarse en uno: mientras la PPT se mantuvo constante en los diferentes grupos, la LTP varió notablemente. Los cambios más notorios se encontraron en la condición de BLK.

Se propone, en contra de teorías prevaecientes, un mecanismo presináptico de modulación de la eficacia sináptica para explicar el surgimiento de la LTP. Se sostiene que en la condición de SPM existe un mecanismo de inhibición presináptica. Este mecanismo se efectúa a través de una vía secundaria colinérgica (nicotínica) que a través de sinapsis axo-axónicas inhibe los botones terminales de la vía primaria excitadora. Para que surja la LTP es necesario bloquear esta vía inhibitoria, ya sea reduciendo la cantidad de fibras aferentes activadas o, de manera más efectiva, bloqueando farmacológicamente las sinapsis axo-axónicas nicotínicas con hexametonio.

Los estudios de ultraestructura, por su parte, corroboraron de manera directa los hallazgos electrofisiológicos. En efecto, en la condición BLK se encontró un mayor número de vesículas adosadas a la zona activa así como un incremento en la longitud de ésta, lo cual, se sabe guarda una relación con una mayor liberación de mediador, que es característica de los procesos de facilitación. Además de estos datos sobre aumento de eficacia sináptica, los resultados histológicos aportaron una posible correlación estructural de la inhibición presináptica. Este hallazgo propio de la condición inhibida SPM fue el empaquetamiento de las vesículas manifestado como una reducción en la extensión que cubre la población vesicular.

Ambos abordajes, electrofisiológico y ultraestructural, proveyeron suficientes argumentos factuales para sostener que la LTP es un proceso de modulación de la eficacia debido al desarrollo de un mecanismo de desinhibición presináptica.

ABSTRACT

This thesis examines the delayed potentiation phenomenon (DP) with its two components, the early, brief, posttetanic potentiation (PTP) and the long lasting, long-term potentiation (LTP) in the cat sympathetic superior cervical ganglion *in situ*. The analysis involved two experimental procedures, electrophysiological and ultrastructural studies. The electrophysiological analysis explored the DP obtained by application of a tetanized train (24 Hz, 30 s) under four different experimental conditions: supramaximal stimulation (SPM), submaximal stimulation (SBM), supramaximal stimulation in semitranssected preganglionic sympathetic trunk (TRN) and supramaximal stimulation under partial blockade with hexamethonium (BLK). Both the temporal course of the post-train effects of DP and the intratrain potentiation-depression phenomenon were studied. In both cases, the main result was the variation in the temporal course profile according to the specific experimental conditions of tetanization. All results may be reduced to one: while the PTP remained constant among the different groups, the LTP varied considerably. The more evident deviations were found in the BLK condition.

A presynaptic modulating mechanism of synaptic efficacy is proposed to explain the emergence of LTP, in disagreement with prevalent theories. A mechanism of presynaptic inhibition is asserted to exist in the SPM condition. This mechanism is executed through axo-axonic synapses of a secondary cholinergic (nicotinic) pathway which inhibit the endings of the primary excitatory pathway. It is necessary to block this inhibitory pathway to allow emergence of the LTP. This may be achieved by reducing the amount of activated afferent fibers or, more effectively, by pharmacologically blocking the nicotinic synapses with hexamethonium.

On the other hand, the ultrastructural studies confirm the electrophysiological findings. Indeed, in the BLK condition a large number of attached vesicles were found at the active zone, which was also longer. This is known to be related to an increase in liberation of mediator, characteristic of the facilitation processes. In addition to the data on increased synaptic efficacy the histologic results contributed with a possible structural correlation of presynaptic inhibition. This finding, germane to the inhibited SPM condition, was the clustering of vesicles appearing as a reduction in extension of the vesicular population. The electrophysiological and ultrastructural approaches provided enough evidence to assert that LTP is a process of efficacy modulation due to the development of a presynaptic disinhibition mechanism.

INTRODUCCION

La modulación de la potenciación a largo plazo (LTP) en el ganglio cervical superior *in vivo* del gato, puede considerarse como un mecanismo sináptico generador de fenómenos de plasticidad neuronal. El hecho de encontrar estos mecanismos en núcleos neuronales periféricos como es el caso del ganglio autonómico, permite contar con modelos experimentales relativamente simples para analizar, a nivel sináptico tanto electrofisiológica como ultraestructuralmente los mecanismos responsables de fenómenos plásticos.

Desde los trabajos clásicos de Cannon y Rosenblueth (1937), Rosenblueth y Simeone (1938), Bronk (1939) y Larabee y Bronk (1938, 1947), se sabe que la potenciación postletánica (PPT) ocurre en el ganglio simpático. Su descripción ha permanecido como una importante contribución a la neurofisiología, porque muestra la capacidad del ganglio para aumentar la eficacia sináptica que excede por varios minutos la duración de la descarga aferente que provoca el fenómeno. Posteriormente Dunant y Dolivo (1966), Brown y McAfee (1982) y Briggs y col (1985a) demostraron que el ganglio simpático desarrolla, junto con el fenómeno de la PPT, un estado facilitatorio que se mantiene por más tiempo (1 a 2 hrs), al cual los últimos autores denominaron potenciación a largo plazo (long-term potentiation LTP) dada su similitud con el fenómeno del mismo nombre encontrado en el hipocampo (Bliss & Lomo, 1973). En esta tesis se designa como potenciación retardada (PR) al fenómeno completo, incluida la PPT y la LTP.

Según Briggs y col (1985a) para detectar la LTP en el ganglio simpático cervical es necesario aumentar la resolución de las medidas relativas de amplitud de potenciación. Consideran que se logra una mayor amplitud desaturando las neuronas ganglionares al reducir la convergencia (Ver Apéndice I). Esta reducción de convergencia se consigue atenuando la activación del ganglio. Al efecto los autores mencionados utilizaron tres procedimientos experimentales: a) estimulación submáxima, b) estimulación supramáxima con sección parcial del nervio preganglionar y, c) estimulación supramáxima en ganglios con bloqueo parcial nicotínico. Briggs y col, sostienen que la LTP es un componente constante de la PR, es decir, que ésta no depende críticamente del procedimiento experimental usado para

provocar la respuesta submáxima postganglionar. Sin embargo una hipótesis alternativa no explorada, es que la LTP no sea un componente constante de la PR, sino que dependa del grado espacial de activación aferente. De hecho, la LTP es muy pequeña después de la activación máxima con un tren tetanizante supremáximo aplicado en ganglios sin bloqueo, y puede ser generada (no simplemente desenmascarada) en grado sustancial sólo cuando el ganglio se tetaniza en condiciones de subactivación. Esta hipótesis alternativa implica un curso temporal variable de la PR que debería reflejarse en las constantes de recuperación de las diferentes condiciones de subactivación.

El trabajo de la presente tesis fue diseñado para decidir entre ambas alternativas, ya que cada una de ellas conlleva una explicación diferente acerca de la generación de LTP. Mientras la primera hipótesis considera a la LTP como un fenómeno rígido no modulado, la segunda presupone un mecanismo modulador responsable de la LTP. El término modulación en este contexto, significa que la transmisión sináptica principal excitatoria, es regulada por otra vía sináptica, la cual determina el curso temporal del efecto de potenciación.

La ingerencia de un mecanismo regulado por la amplitud de las descargas aferentes y por el consecuente nivel de activación ganglionar, y la aparición del fenómeno bajo hexametonio indicarían la mediación de receptores nicotínicos diferentes a los receptores nicotínicos postsinápticos de las células ganglionares.

La hipótesis de modulación se concibió, en parte, por los datos de potenciación obtenidos en ganglios parcialmente bloqueados con d-tubocurarina (Eccles, 1952) o con hexametonio (Morales y col, 1985). En estas condiciones, el tiempo de aparición de la cima o efecto máximo de potenciación se retrasa varios segundos y la pendiente de recuperación del fenómeno se alarga en comparación al efecto obtenido en las preparaciones sin bloqueo. No obstante que los registros en estos trabajos no fueron lo suficientemente prolongados para emitir un juicio definitivo sobre la aparición de la LTP, muestran sin embargo, que los cambios en la eficacia sináptica provocados por la tetanización pueden alterarse por la acción de compuestos antinicotínicos.

El análisis experimental de la LTP se realizó con dos abordajes electrofisiológico y ultraestructural. En todos los experimentos los registros postrén se extendieron hasta 3000 s (50 minutos). Se exploraron

las mismas condiciones experimentales analizadas por Briggs y col (1985a): estimulación submáxima, estimulación supramáxima en nervios preganglionares parcialmente seccionados, y estimulación supramáxima en preparaciones con bloqueo parcial por hexametonio. Se incluyó además un grupo de experimentos con estimulación supramáxima en preparaciones sin bloqueo, para dilucidar si la LTP se desarrolla ó no bajo esta condición experimental. Para determinar las diferencias en el curso temporal de la PR obtenida en cada condición experimental, se midió y comparó estadísticamente la amplitud del efecto de potenciación, así como las pendientes de recuperación tanto del proceso temprano o PPT como del tardío o LTP. Con la misma intención, se midió y comparó el tiempo de aparición de la cima. Estas medidas son importantes por que permiten detectar distorsiones en el curso temporal de la PR. Además de los registros posttrén, se estudiaron los registros obtenidos durante la aplicación del tren (registros intratrén o tetánicos). De igual manera se midieron y compararon estadísticamente las características del curso temporal intratrén. Finalmente, se usó la preparación *in vivo* por dos razones. Primero para poder comparar con la extensa literatura de potenciación en ganglio donde no se reporta LTP (ver monografía de Rosenblueth, 1950) y segundo como control de las posibles influencias que la temperatura y la hipoxia pudieran ejercer en preparaciones *in vitro*.

En los experimentos de ultraestructura, se exploraron las sinapsis ganglionares bajo dos condiciones experimentales, estimulación supramáxima en preparaciones sin bloqueo y, en preparaciones con bloqueo. Además se estudiaron sinapsis de ganglios sin tren y sin bloqueo como control.

El material aquí presentado, ha dado lugar a cuatro comunicaciones a congresos (Soza-Bulnes y col, 1984; Morales y col, 1985; Morales y col, 1987; Morales & Alonso-deFlorida, 1988) y a tres trabajos de publicación (Alonso-deFlorida & Morales, 1989; Morales & Alonso-deFlorida, 1989; Morales & col, 1989).

En la tesis me he centrado en la investigación señalada. Otros aspectos del significado y alcance del tema en cuestión se tratan en apéndices. Considero que de esta manera no se distrae la atención del lector.

METODO

Animales

Tanto en los experimentos electrofisiológicos como en los de ultraestructura, se usaron gatos adultos (*Felis catus*) de uno y otro sexo, que pesaban entre 2 y 3.5 kg. Se les aplicó anestesia general con cloralosa (hidrato de cloral 85 mg/kg) por vía intraperitoneal. La temperatura corporal del animal se mantuvo colocándolo en una cámara para administrarle calor de manera regulada.

Experimentos de Electrofisiología

Preparación *in situ*

Según una técnica ya descrita (Alonso-deFlorida y col, 1960; Pardo y col, 1963) se preparó *in situ* el ganglio simpático cervical superior para estimular el tronco simpático y registrar los nervios postganglionares (carotídeo interno y externo). Bajo anestesia general se sujetó al animal en posición supina y, mediante un dispositivo similar al de un aparato estereotáxico, se fijó la cabeza. Se practicó una incisión longitudinal de unos 13 cm en la cara ventral del cuello. Se disecó por planos hasta llegar a la tráquea la cual se seccionó y canuló. Luego de extirpar una porción del esófago, se alcanzaron los músculos prevertebrales los cuales se separaron y seccionaron a nivel de su inserción en el axis. A continuación se localizó el ganglio cervical superior así como el paquete nervioso formado por el vago con su ganglio nodoso, el nervio lingual y los nervios postganglionares carotídeo interno y externo. La disección de los nervios pre y postganglionares se hizo teniendo cuidado de no dañar la circulación del ganglio. En el paquete vasculonervioso del cuello se disecó el tronco simpático cervical en tres sitios diferentes: a 3 cm del ganglio a fin de realizar posteriormente una maniobra de sección parcial, a 6 cm para instalar el electrodo de estímulo, y a 9 cm para descentralizar y, en algunos casos (ver abajo) para instalar un electrodo de registro de los potenciales de acción del nervio. Se disecó el nervio

postganglionar incluyendo ambas ramas y enseguida se seccionó en su entrada al cráneo por encima de la ampolla auricular. Con un hilo de nylon muy delgado se aló el cabo distal del nervio postganglionar; este cabo se lesionó por machacamiento con unas pinzas finas y al terminar la disección, los nervios se colocaron en sendos electrodos.

El electrodo postganglionar consistió en dos placas de platino de 4 mm de ancho y 0.2 mm de grosor, dispuestas paralelamente con una separación de 2 mm y embebidas en acrílico dental. Una perforación de 0.6 mm de calibre atravesaba tanto las placas de platino como el acrílico. A través de dicha perforación se pasó el hilo alado al nervio postganglionar. Luego, tirando del hilo, se introdujo el nervio a la perforación, de modo que quedara firmemente en contacto con las placas de platino, y que una de éstas quedara en contacto con la porción lesionada del nervio (la distal al ganglio) y la otra con la porción intacta (la proximal).

El electrodo de estímulo fue similar al de registro. Consistió de dos placas de platino embebidas en acrílico, pero en vez de la perforación tenía una ranura de 0.8 mm de ancho en la que se colocó el nervio preganglionar en contacto con las placas de platino sin necesidad de seccionarlo. Ya colocado el nervio, se relleno la ranura con cera neurológica, a fin de sujetarlo en contacto estable con los bordes de las placas y reducir la resistencia eléctrica externa. En algunos experimentos se empleó además otro electrodo de registro de las mismas características que el postganglionar, para el registro del nervio preganglionar.

Los electrodos se sujetaron con un dispositivo mecánico a fin de evitar desplazamientos durante las maniobras experimentales. Ya colocados los nervios en sus respectivos electrodos, se cubrió la preparación con aceite mineral contenido en una poza formada por los colgajos de piel. Con esta técnica se obtuvieron registros muy estables debido a la alta resistencia eléctrica externa al nervio. Además se aseguró la constancia de la intensidad eléctrica aplicada durante todo el experimento mediante un control electrónico incluido en la unidad de aislamiento.

Mediante un estimulador Grass S4DR, y su respectiva unidad de aislamiento WP PC1, se generaron pulsos cuadrados bifásicos de 0.2 ms y 0.1 Hz que se aplicaron al tronco cervical. Las respuestas obtenidas a través del electrodo de registro se amplificaron mediante un preamplificador extracelular

Dagan 2400 y un Grass P15 y luego se derivaron a un osciloscopio Tektronix 5103N y, desplegados en la pantalla, se fotografiaron con una cámara Grass C4R.

Protocolo

Pulsos de prueba. Justo antes de iniciar cualquier estimulación, se descentralizó el ganglio por sección de la cadena simpática 3 cm caudalmente del electrodo de estímulo. En aquellos experimentos, en los que se registró el nervio preganglionar, el electrodo de registro se colocó en el cabo distal después de la descentralización. Posteriormente se colocó la preparación en una cámara de Faraday para su registro electrofisiológico. En seguida se inició la estimulación del tronco simpático con pulsos administrados a 0.1 Hz, frecuencia que se mantuvo durante todo el experimento, excepto al aplicar un tren tetanizante. Cada pulso cuadrado biláscico de 0.2 ms de duración aplicado al nervio preganglionar, provocó un potencial de acción compuesto postganglionar monofásico registrado en las fibras postganglionares, con sus cuatro ondas rápidas negativas (S_1 , S_2 , S_3 y S_4) su onda positiva (P) y su onda lenta negativa (LN) según describieron Bishop y Heinbecker (1932) y Eccles (1932). Se registraron todas las respuestas provocadas por los pulsos de estimulación. A fin de estandarizar la magnitud de las respuestas, la intensidad de los pulsos se ajustó 25% sobre la intensidad que produjo la respuesta máxima. Estos estímulos supramáximos se mantuvieron durante una hora a fin de probar la estabilidad de las respuestas. En seguida se aplicaron aproximadamente 10 pulsos a intensidades variables para determinar la curva de intensidad del estímulo *versus* la amplitud de la respuesta. Una vez determinada la curva, se restableció la estimulación supramáxima. La última respuesta de esta secuencia se designó como R_F y marcó el inicio del experimento propiamente dicho.

Grupos experimentales. Cerca de 5 minutos después de R_F , se efectuó, según los cuatro diferentes grupos experimentales (9 animales por cada grupo), una de las siguientes maniobras (Fig. 1):

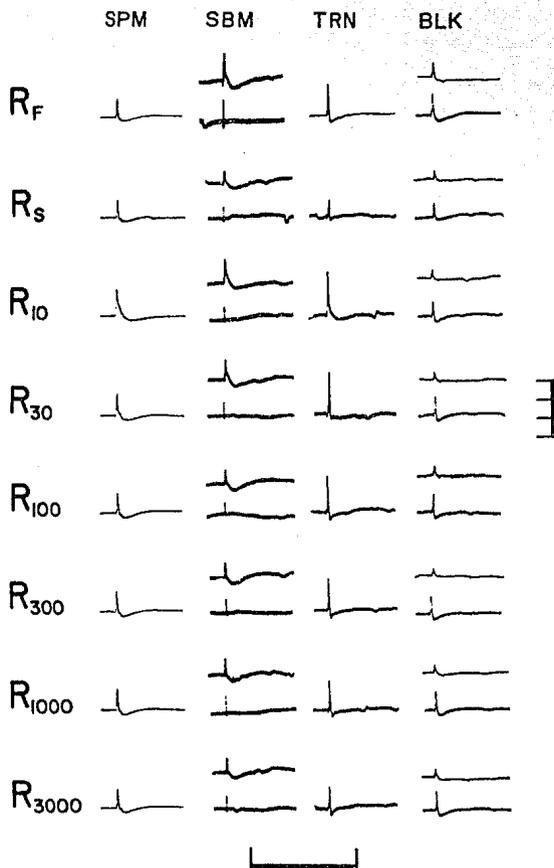


Fig 1. Ejemplos de potenciales de acción compuestos preganglionares y postganglionares provocados por la aplicación al tronco simpático de pulsos cuadrados bilátricos de 0.2 ms y 0.1 Hz bajo diferentes condiciones experimentales. En las filas se muestran los registros obtenidos en diferentes tiempos del protocolo. R_F, registros obtenidos al principio de los experimentos. Poco después de R_F (aproximadamente 5 minutos) las condiciones experimentales se modificaron de la siguiente manera: SBM, se redujo la intensidad de los pulsos de estímulo; TRN, se seccionó parcialmente el nervio preganglionar en un sitio intermedio entre el electrodo de estímulo y el ganglio; BLK, se aplicó por vía intravenosa una dosis de 2.25 mg/kg de hexametonio; SPM se mantuvo sin cambios. Veinte minutos después de R_F se obtuvo el R_S. Justo después de R_S (10 s) se aplicó un tren tetanizante con la misma intensidad de 24 Hz durante 30 s. Los registros de R₁₀ a R₃₀₀₀ son las respuestas obtenidas a diferentes tiempos (indicados en segundos por el número del subíndice) después de terminado el tren. Los trazos superiores e inferiores en cada fila de la columna de SBM corresponden al registro simultáneo de los potenciales postganglionar y preganglionar respectivamente. El par de trazos de la columna de BLK son los registros simultáneos de cada ganglio en un mismo experimento, el tren se aplicó sólo en un ganglio (trazo inferior), el otro ganglio sin tren (trazo superior) sirvió para estimar el nivel de bloqueo a lo largo del experimento. Las columnas SPM y TRN incluyen sólo el potencial postganglionar del ganglio estimulado. Calibraciones: Tiempo: 1 s. Voltaje: SPM, 2 mV/división; SBM, trazo superior 0.2 mV/división, trazo inferior 0.1 mV/división; TRN, 0.4 mV/división en R_F y 0.2 mV/división de R_S a R₃₀₀₀; BLK, ambos trazos 0.4 mV/división.

i) A través de una cánula, instalada en la vena femoral derecha al inicio de la preparación, se administró una dosis (2.25 mg/kg) de hexametonio diluido en 10 ml de solución salina, a temperatura corporal, durante 2 minutos. Durante la aplicación de la droga, se registró una caída progresiva en la amplitud del potencial postganglionar debida al bloqueo de la transmisión. La amplitud del bloqueo se estabilizó entre los 12 y 15 minutos después de inyectado el fármaco. Los experimentos sujetos a esta maniobra se designaron como BLK.

ii) Sobre el nervio preganglionar, bajo control microscópico y con unas tijeras finas, se practicó una sección parcial de las fibras en un sitio entre el ganglio (3 cm) y el electrodo de estímulo (3 cm). A los experimentos de este grupo se les llamó TRN

iii) Se disminuyó la intensidad del estímulo hasta obtener respuestas submáximas. Este grupo de experimentos se designó SBM.

iv) No se realizó ninguna maniobra experimental sino que la condición de estímulos supramáximos se mantuvo constante; los experimentos se llamaron SPM.

En los grupos BLK, TRN y SBM la respuesta inicial R_F se redujo a un valor estable, registrado 20 minutos después como R_S . Los 20 minutos transcurridos entre R_F y R_S se dejaron para estabilizar la magnitud de las respuestas después de realizada alguna de las maniobras descritas. El efecto de reducción se estimó como la razón V_S/V_F , donde V_S es la amplitud de la onda S_2 en el potencial R_S ; y V_F es la amplitud de la misma onda en la respuesta R_F . En el grupo de bloqueo (BLK) esta razón, o sea la profundidad del bloqueo alcanzada con la dosis única de 2.25 mg/kg de hexametonio, varió considerablemente de experimento a experimento, a pesar de que todos los animales de este grupo fueron nefrectomizados; la razón fue 0.25 ± 0.05 (media \pm E.E.). Por otra parte, la cantidad de reducción que se obtuvo con cada maniobra, a excepción del grupo BLK, es relativamente controlable. En el grupo TRN se controló hasta cierto punto, regulando la amplitud del corte al nervio, en cambio en el grupo SBM esta cantidad fue totalmente controlable, ya que siempre es posible fijar con exactitud la intensidad de corriente necesaria para obtener la amplitud requerida. Nuestra intención fue comparar tanto el efecto tetánico como el posttetánico (retardado) entre los diferentes grupos experimentales bajo la condición de que la reducción de la respuesta obtenida en cada grupo no difiera

significativamente. Para lograr este propósito, por cada determinado valor obtenido con el bloqueo se trató de obtener uno similar, regulando la dimensión del corte, en el grupo de sección parcial del tronco; y uno exactamente igual, regulando la intensidad del estímulo, en el grupo de estimulación submáxima. De esta manera y realizando suficientes experimentos (9 por grupo) logramos obtener medias semejantes de los valores de reducción en los tres grupos, según confirmamos con una prueba t de Student. La media (\pm E.E.) de las respuestas basales de reducción en los tres grupos en conjunto (27 experimentos) fue $V_F/V_S = 0.29 \pm 0.03$.

Tetanización. Diez segundos después de registrar R_S , se aplicó un tren de pulsos de 24 Hz durante 30 s. (ó con los parámetros indicados en los experimentos adicionales que mencionaremos en la sección de Resultados) en sustitución de la frecuencia basal de 0.1 Hz. Las respuestas intratrén (una cada 47 ms) también se registraron. En los experimentos control (al menos cinco por cada grupo experimental) no se aplicó el tren: en vez de ello se mantuvo la frecuencia basal baja de 0.1 Hz durante todo el experimento.

Estimación de las respuestas. El registro basal entre cada estímulo fue lo suficientemente estable como para efectuar las medidas (distancia de la línea basal al pico de la onda S_2) con suficiente precisión. La amplitud V_S de la onda S_2 en la respuesta R_S obtenida 10 s antes de iniciado el tren fue la que se tomó como referencia para medir los cambios de amplitud de la misma onda en todas las respuestas posteriores. Diez segundos después de terminado el tren se restableció la frecuencia basal de 0.1 Hz, y se tomaron todos los registros uno cada 10 s durante los siguientes 3000 s (50 minutos). En los experimentos control donde no se aplicó el tren se siguió una estimulación y registro con la frecuencia de 0.1 Hz. Las respuestas provocadas por los pulsos intratrén fueron designadas como R_j y las provocadas con la estimulación basal como R_i . El valor de estas respuestas se estimó como la razón V_j/V_S para las respuestas intratrén y V_i/V_S para las respuestas postrén, donde V_j y V_i son la amplitud de la onda S_2 en las respuestas R_j y R_i respectivamente.

Registros del tronco simpático. En vista de los resultados contingentes que Briggs y Col (1985a) obtuvieron en el grupo experimental SBM y que ellos interpretaron como reclutamiento de fibras preganglionares, se decidió en este grupo de experimentos registrar simultáneamente, además del

potencial postganglionar, el potencial del nervio preganglionar. Para ello empleamos otro electrodo de registro instalado en el nervio preganglionar a 3 cm caudal con respecto al electrodo de estímulo. Después de descentralizar al ganglio, con la misma técnica del hilo y el amarre pasamos el nervio preganglionar a través de la perforación del electrodo. De esta manera con cada pulso obteníamos simultáneamente dos registros, uno del potencial postganglionar y otro del potencial de nervio preganglionar. Según los registros que obtuvimos, el potencial del nervio preganglionar no se modificó significativamente ni durante ni después del tren (Fig 1). Este dato asegura que los cambios encontrados en los registros postganglionares se debieron a modificaciones en la sinapsis ganglionar y no a reclutamiento o algún otro cambio a nivel de las fibras nerviosas aferentes.

Niveles de bloqueo. En el grupo de bloqueo nicotínico parcial (BLK) se prepararon y registraron ambos ganglios; en uno se aplicó el tren de alta frecuencia, mientras el otro, que se dejó sin tren, sirvió como control para medir el nivel y estabilidad del bloqueo. Una factor importante acerca de este grupo de experimentos es la mantener la estabilidad del bloqueo producido por el hexametonio. En efecto, según vimos en una serie experimental previa (Morales, 1989; Morales & Alonso-deFlorida, 1989), el nivel máximo de bloqueo perdura por muy poco tiempo (entre 10 y 15 minutos) y a partir de ese momento el bloqueo desaparece lentamente, lo que se evidencia por el restablecimiento paulatino de la transmisión ganglionar. Esta recuperación por si misma distorsiona la curva de potenciación producida por el tren. La manera de resolver este problema, intrínseco a las preparaciones *in vivo*, es eliminar los riñones (Paton y Zaimis, 1952). Para ello a los animales de este grupo se les practicó una nefrectomía por vía lumbar antes de iniciar la cirugía de cuello y; en efecto, con la nefrectomía se mantuvieron constantes los niveles de bloqueo ganglionar a lo largo de todo el tiempo experimental (Figs 1 y 4). En la serie previa antes mencionada de 10 animales no nefrectomizados, encontramos una recuperación o salida del nivel de bloqueo que se manifestó como una curva exponencial creciente de la amplitud del potencial. (Morales, 1989; Morales & Alonso-deFlorida, 1989).

Secuencia de experimentos. Se realizaron de 2 a 4 experimentos por semana en días diferentes. Cada serie incluyó un experimento de cada tipo más su respectivo control. Se realizaron series

completas en sucesión, de tal manera que se distribuyeron estocásticamente los diferentes tipos de experimentos.

Ajuste de funciones a los datos experimentales.

Para estudiar la conducta de las dos escalas de tiempo encontradas en las respuestas, (escalas PPT y LTP) se ajustó la función $f(t) = pe^{-bt} + te^{-dt}$ a los datos. Los parámetros p , b , y d sirven para caracterizar a las respuestas. La función fue ajustada por mínimos cuadrados. Sin embargo, la gran diferencia que existe entre las escalas de tiempo de $1/b$ y $1/d$ impuestas por los mismos datos, no permitió el uso de la rutina estándar de optimización para encontrar los mínimos residuos. En vista de lo anterior se utilizó un método directo tipo simplex (Nelder y Mead, 1965) para encontrar los valores deseados por un camino confiable, a expensas de un aumento en el tiempo de cómputo empleado.

Para ajustar sus datos Briggs y col (1985a) emplearon otro método directo en el que arbitrariamente parten el fenómeno total en dos procesos, uno lento y otro rápido y ajustan separadamente cada proceso para sumarlos al final. Nosotros encontramos que el método simplex que empleamos no presenta la restricción de decidir *a priori* el punto de inflexión entre los dos procesos de la curva.

Experimentos de ultraestructura

Técnica de perfusión y fijación *in situ*.

Se usó una técnica semejante a la originalmente descrita por Trendelenburg (1954) para inyecciones intrarteriales al ganglio cervical superior. En 9 gatos previamente nefrectomizados, se disecaron primero los nervios pre y postganglionares, y luego los vasos sanguíneos que rodean al ganglio cervical superior. Se disecaron, las arterias carótida primitiva, carótida externa, maxilar y lingual. A través de esta última se pasó una cánula de polietileno de 0.1 mm de diámetro interno. La canulación no interfirió con la circulación normal del ganglio. Según el protocolo ya descrito, se aplicó el tren tetanizante de 24 Hz durante 30 s; diez segundos después se restablecieron los pulsos de prueba a 0.1 Hz (1/10 s), mismos que se mantuvieron en los siguientes 3000 s postrén. Al final de este período se realizó la

perfusión y fijación del ganglio. Justo a los 3000 s se ligó la carótida primitiva y la maxilar, inmediatamente después, a través de la lingual canulada se pasó a presión constante de aproximadamente 150 mm de Hg, primero solución salina a temperatura corporal para lavar la sangre de los vasos, seguida de solución de Karnovsky modificado diluida al 50% a temperatura ambiente para fijar el tejido. La solución salina se mantuvo en una jeringa a 38-39° C y el fijador en un matraz a temperatura ambiente. Para lograr la secuencia y control de la perfusión y fijación a presión constante se emplearon una llave de paso de tres vías y un manómetro (Fig 2).

Esta técnica de perfusión permite fijar rápida y homogéneamente todo el tejido ganglionar dado que el fijador alcanza el tejido a través de la propia vascularización ganglionar. Por otra parte este proceder permite visualizar los registros postganglionares durante la secuencia de fijación y asegurarse de su efectividad (Fig 2). Kadota y Kadota (1982) también emplearon esta técnica sólo que inyectaron directamente el fijador a través de una jeringa.

Los registros de los potenciales postganglionares se obtuvieron durante todo el período postrén incluido la secuencia de desaparición paulatina (40 a 60 s) de los potenciales como consecuencia de la fijación (Fig 2).

Al término de la fijación *in situ* (20 minutos de perfusión) se extrajo el ganglio y se continuó su fijación por inmersión en solución de Karnovsky modificado al 100% durante una hora. Después se cortó en tres segmentos iguales, tercio cefálico, medio y caudal que se pasaron a una solución amortiguadora de cacodilatos en la cual permanecieron 24 hrs. Posteriormente se postfijaron con tetraóxido de osmio al 0.1% y seguidamente se pasaron a una solución de acetato de uranilo al 5% en agua, donde permanecieron una hora. Se deshidrataron con concentraciones crecientes de alcohol y óxido de propileno. Finalmente se impregnaron e incluyeron en bloques de resina epóxica.

Para el estudio de microscopía se escogió el tercio medio del ganglio debido a que es la región donde se encuentran más sinapsis (Birks, 1974). Se obtuvieron en orientación transversal, primero cortes semifinos de 1 µm de grosor para microscopía de luz, en estos cortes se escogió una región adecuada para obtener, sin modificar la orientación transversal, cortes finos de 40 a 60 nm de grosor (color de interferencia plateado). Los cortes se contrastaron con acetato de uranilo y citrato de plomo y luego se

observaron en un microscopio electrónico Zeiss EM-9. De cada ganglio se obtuvieron al menos 20 micrografías con una amplificación final de 24000. Cada micrografía incluía el menos una sinapsis química en orientación transversal donde se distinguía claramente el botón presináptico y su zona activa, la hendidura y la membrana subsináptica.

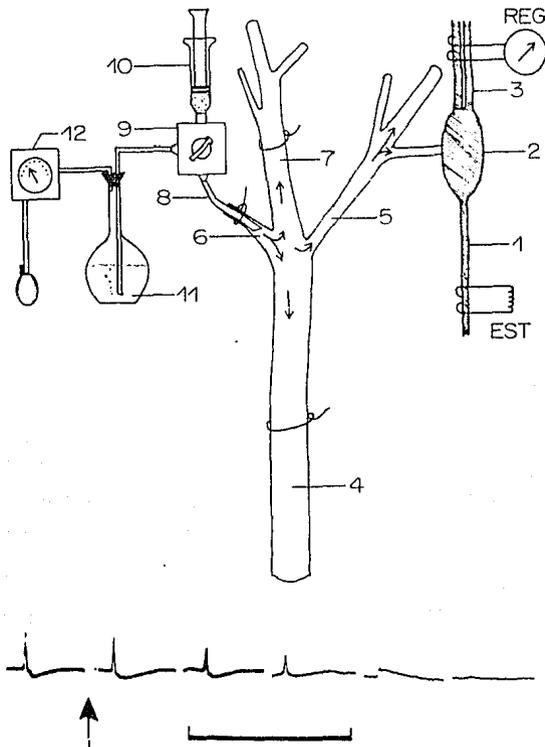


Fig 2. Esquema de la técnica de perfusión y fijación del ganglio simpático cervical superior *in situ* del gato, y secuencia de desaparición de los potenciales de acción compuestos postganglionares como consecuencia de la fijación. Se esquematizan, el tronco simpático (1) en el cual se aplican los estímulos, el ganglio (2), las raíces postganglionares (3) en las que se obtienen los registros. Se representa también el sistema arterial circundante al ganglio formado por las arterias carótida primitiva (4), occipital (5), lingual (6) y maxilar (7). La arteria lingual se canula con un catéter de polietileno (8) a través del cual y por medio de una llave de paso de tres vías (9) se pasa primero solución salina a temperatura corporal contenida en una jeringa (10), seguida de fijador de Karnovsky modificado diluido al 50% depositado en un matraz (11). El paso del fijador se hace a presión constante (140 mm de Hg) usando un manómetro (12). Se muestran los sitios donde se ligan las arterias al inicio de la perfusión. En la parte inferior de la figura se muestra la secuencia temporal de la desaparición de los potenciales como consecuencia de la llegada de fijador al ganglio. La frecuencia de los pulsos es de 0.1 Hz (uno c/10 s), sin embargo se muestra la secuencia de potenciales alternos, es decir, obtenidos cada 20 s. La flecha indica el momento de aplicación del fijador. Calibraciones: Tiempo 1 s; voltaje 0.5 mV.

Parámetros sinápticos:

En cada sinapsis se midieron los siguientes parámetros: i) la población total de vesículas presentes en cada terminación presináptica; ii) el perímetro mínimo convexo, *i.e.* el perímetro mínimo de un polígono que cubra a todas las vesículas (Fig 3), que equivale a una medida directa de la extensión del área presináptica ocupada por vesículas; iii) el número de vesículas adosadas a la zona activa; iv) la longitud de la zona activa y; v) la densidad de vesículas adosadas, en referencia a la longitud de la zona activa (vesícula/ μm) y al área adyacente a esta zona (vesículas/ μm^2) en una franja de 50 nm (diámetro de una vesícula).

Grupos experimentales

Se investigaron tres grupos experimentales con tres gatos por grupo y un ganglio por gato*. Los ganglios del grupo de bloqueo parcial nicotínico (BLK) fueron tratados con hexametonio (2.25 mg/kg) y se les aplicó un tren tetanizante de pulsos supramáximos a 24 Hz durante 30 s. El grupo de estimulación supramáxima (SPM) fueron preparaciones sin bloqueo y con aplicación del tren tetanizante. Por último se estudió un grupo sin bloqueo y sin aplicación de tren (Control), a cuyos ganglios sólo se les mantuvo la estimulación basal de pulsos de prueba a 0.1 Hz, uno c/10 s.

*No obstante lo reducido de la n (tres ganglios por grupo) se decidió presentar estos datos como una primera aproximación a las evidencias ultraestructurales de la LTP ganglionar. Actualmente se están elaborando los demás experimentos para completar una n de 6.

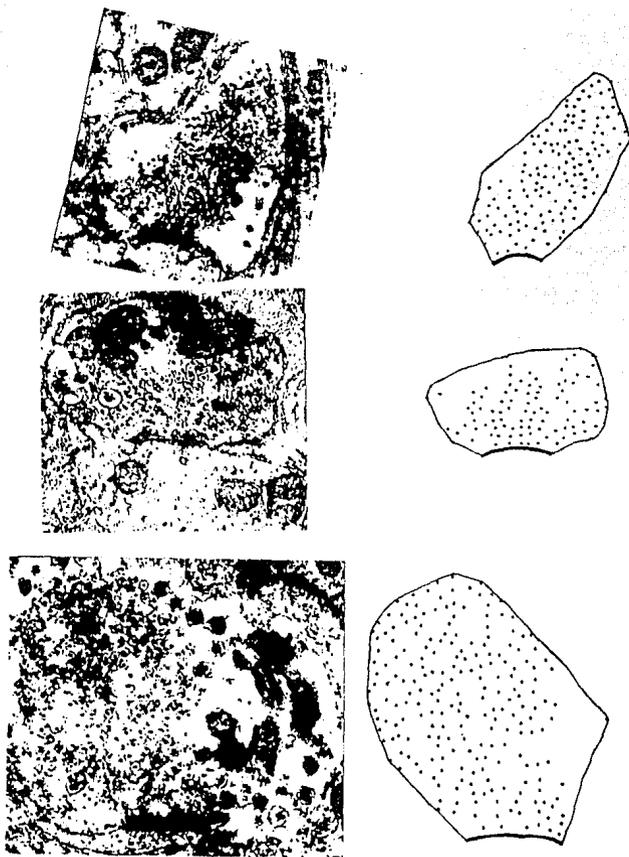


Fig 3. Expansión de la población vesicular. A la izquierda se muestran micrografías de sinapsis con un punteado en sus vesículas. A la derecha se enseña sólo el punteado. Sobre este punteado se estableció un polígono de perímetro mínimo, cuya área incluye a todas las vesículas. Tanto el perímetro (línea delgada) como la longitud de la zona activa (línea gruesa) se calcularon con un medidor de mapas. En las micrografías se muestran sinapsis típicas de cada uno de los tres grupos experimentales, a saber: Fila superior, preparaciones control sin tren ni hexametonio. Fila intermedia, preparaciones fijadas 50 minutos después de la aplicación del tren tetanizante (24 Hz, 30 s) sin hexametonio. Fila inferior, ganglio fijado 50 minutos después del tren en preparaciones tratadas con hexametonio (2.25 mg/kg). Los efectos no se ven claramente en casos individuales como éstos; se requieren las estadísticas (ver Figs 12 y 13).

RESULTADOS

Polenciación retardada (PR) en el ganglio *in vivo*

El ganglio simpático cervical superior *in situ* del gato, a temperatura corporal y normalmente irrigado, desarrolló un aumento en la amplitud de los potenciales de acción postganglionares (medida sobre la onda S₂) por al menos 3000 s (50 minutos) en respuesta a pulsos de prueba aplicados en el tronco preganglionar, y como consecuencia de la aplicación de un tren tetanizante por la vía aferente (Figs 1 y 4). La respuesta aumentó rápidamente inmediatamente después de terminado el tren, alcanzó una cima seguida por un curso temporal de disipación en dos etapas: una etapa temprana y rápida reconocida como potenciación posttetánica y otra tardía y lenta identificada como potenciación a largo plazo. Con fines descriptivos llamamos potenciación retardada al conjunto de los dos estados.

La LTP se encontró como un proceso de caída o de crecimiento lento y progresivo durante todo el tiempo experimental. La función de suma de dos exponenciales, $f(t) = pe^{-bt} + le^{-dt}$ se ajustó razonablemente bien a los datos medidos a partir de la cima. La primera exponencial describe la fase rápida y temprana (PPT) y la segunda la fase lenta y tardía (LTP), independientemente de que ésta haya sido creciente o decreciente; con exponente positivo se denotan las caídas y con negativo las subidas. En algunos experimentos, especialmente los de la condición de SBM, el curso de la PR presentó un "valle" que se apartó notoriamente de la curva de ajuste. Este valle se formó con la caída pronunciada de la primera fase hasta valores bajos de potenciación en tiempos tempranos y una subsecuente recuperación hasta alcanzar el curso normal de la LTP. Ocasionalmente esta desviación resultó más compleja hasta aparecer como una oscilación amortiguada (Fig 4). Para poder ajustar la función a los datos anómalos de estos experimentos fue necesario suprimir algunos puntos del valle.

Como originalmente observaron Rosenblueth y Simeone (1938) es notoria la inestabilidad en el curso temporal de la condición submáxima. Esta condición experimental se caracterizó precisamente por una mayor variación en sus pendientes de recuperación, por la frecuencia de aparición de valles (8 de 9 experimentos, según puede verse en la Tabla I) y por la presencia de oscilaciones, en contraste con

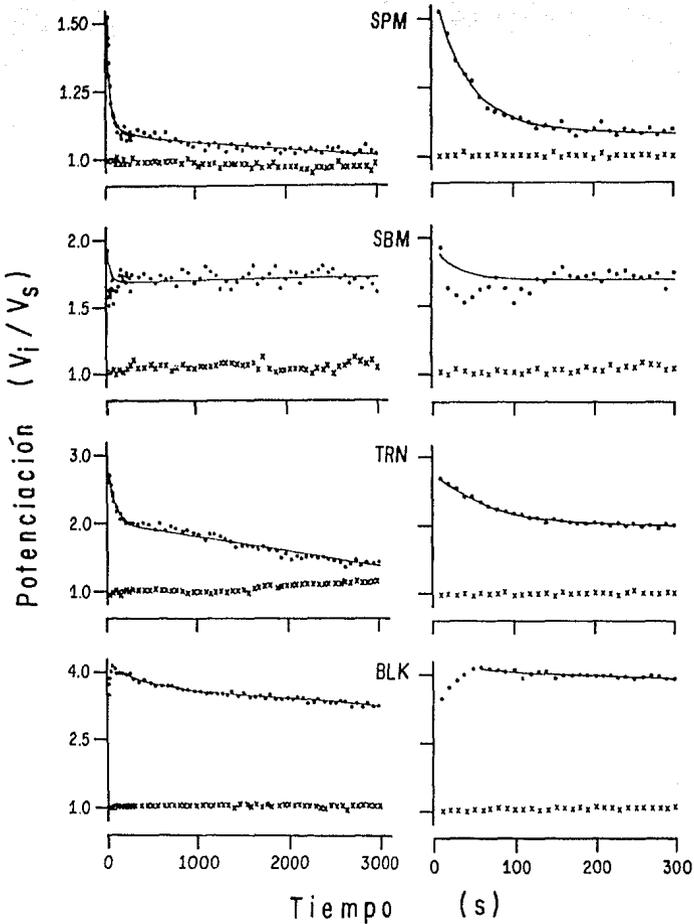


Fig 4. Ejemplos del curso temporal (●) de la potenciación retardada bajo las diferentes condiciones experimentales investigadas. SPM experimentos supramáximos, SBM experimentos submáximos, TRN experimentos de sección parcial, BLK experimentos con bloqueo parcial. En todos los casos se aplicó un tren tetanizante de 24 Hz durante 30 s. El tiempo cero indica el final del tren. Ordenadas, cantidad de potenciación medida como el índice V_i/V_S , donde V_i es la amplitud de la onda S_2 de cada registro R_i obtenido después de terminado el tren y V_S es la amplitud de la misma onda en el registro R_S obtenido justo antes de aplicar el tren. Se grafican también los registros de los experimentos control (x) cuando no se aplica el tren tetanizante. En la columna de la izquierda se muestran los registros a lo largo de los 3000 s (50 minutos) del curso temporal posttrén. En la columna de la derecha se presentan los cambios temporales de los primeros 300 s (5 minutos). A los puntos experimentales, a partir de la cima se les ajustó la función $f(t) = pe^{-bt} + te^{-dt}$. La desviación de los puntos de la función de ajuste en el grupo SBM se discute en el texto.

las demás condiciones, especialmente con bloqueo, donde las variaciones de las pendientes fueron pequeñas y no se encontró ningún valle. Esta inestabilidad de la condición submáxima es un fenómeno genuinamente sináptico, según se confirma por el método que empleamos, ya que no se detectaron modificaciones en el registro del potencial de acción compuesto del nervio preganglionar (ver sección de Método), lo que garantiza que no existen cambios en el número de fibras excitadas del nervio preganglionar como sugirieron Briggs y col (1985a).

Tabla I. Frecuencia de valles en los registros de la pendiente de PPT

	Condiciones experimentales			
	SPM	SBM	TRN	BLK
Con valle	3	8	2	0
Sin valle	6	1	7	9
Total	9	9	9	9

Los datos se presentan en una tabla de contingencia de 2×4 . Se aplicó una prueba de Fisher (Fisher, 1950; Sokal & Rohlf, 1981) para tablas de contingencia de 2×2 donde se compara la incidencia de cada grupo contra la incidencia agrupada de los otros tres. La hipótesis nula de no interacción (o independencia) se rechaza para SBM ($p=0.0003$) y para BLK ($p=0.01$), pero no para SPM ($p=0.3$) y TRN ($p=0.2$), lo cual se interpreta como una notable incidencia de valles en SBM y muy poca en BLK.

Los cursos ascendentes de la LTP también los encontraron Briggs y col (1985a) en experimentos de ganglio *in vitro* realizados a 32° C, cuando estos mismos experimentos los realizaron a temperatura ambiente (22° C) todos los cursos fueron de caída. Así mismo, Koyano y col (1985) encontraron cursos ascendentes en registros intracelulares de ganglio de rana, en ese también describieron valles como los aquí descritos.

Variación del curso temporal de la PR

Una desaceleración pronunciada que ocurrió después de cierto instante en el curso de la potenciación retardada fue una buena justificación para definir dos estados distintos, PPT y LTP. Para diferenciar estos dos estados Briggs y col (1985a) midieron en la preparación *in vitro* a temperatura

ambiente las constantes de caída $\tau_p=1/b$ y $\tau_l=1/d$ de la función $f(t)=pe^{-(t/\tau_p)}+le^{-(t/\tau_l)}$ ajustada a la curva de la PR. Sin embargo, a temperatura corporal, aunque τ_p es un parámetro útil para estimar el curso de la PPT, τ_l no se puede aplicar ya que en esta circunstancia el curso de la LTP no siempre es de caída, sino que en ocasiones es de subida. Para superar este problema, en nuestros estudios realizados en preparaciones *in vivo* a temperatura corporal, estimamos la rapidez de cambio de estos fenómenos directamente de los valores de b y d . No obstante, en la tabla II incluimos los valores que obtuvimos para τ_p y τ_l de la función ajustada a los valores promedio de nuestros datos; estos promedios siempre mostraron una LTP de caída. Los valores de b y d fueron sometidos a un análisis de bivariación estadística (Morrison, 1978) que nos permitió comparar los perfiles de potenciación entre los diferentes grupos experimentales.

Tabla II. Constantes de caída de la PR

	SPM	SBM	TRN	BLK
τ_p (s)	18.01	10.44	43.25	184.64
τ_l (minutos)	320.51	535.91	128.21	529.10

Los valores se calcularon de la función $f(t)=pe^{-(bt)}+le^{-(dt)}$ ajustada a los valores promedio de los datos de potenciación encontrados, en donde $\tau_p=1/b$ y $\tau_l=1/d$. Las comparaciones así como la estadística se describen en la Fig 5.

Las diferencias entre los dos estados que conformaron el curso temporal de la PR fueron muy marcadas dado que la rapidez de cambio en la PPT fue de 2 o 3 órdenes de magnitud mayor que la de LTP. Como puede apreciarse en la Fig 5 el curso de la PR en los experimentos BLK se caracterizó por parámetros de recuperación más lentos, tanto en el fenómeno temprano (PPT) como en el tardío (LTP), estimados con los valores de b y d respectivamente. En este grupo el valor de d fue de dos ordenes de magnitud menor que el valor de b . Esta correlación indica que en el ganglio sujeto a la condición experimental BLK la desaceleración entre el fenómeno rápido y el lento es menor, y que por consiguiente, el curso de la PR tiende a ser un solo proceso de efecto prolongado. Los experimentos SPM y SBM en cambio, mostraron una desaceleración más marcada, el valor de b fue de tres órdenes de magnitud mayor que el de d . Resulta, sin embargo, que la rapidez de recuperación en la etapa lenta (LTP) tuvo

valores similares en los tres grupos SPM, SBM, y BLK (estas comparaciones se muestran en el análisis bivariado que aparece en el pie de la Fig 5). Por otra parte, no se encontraron diferencias entre los grupos SPM y SBM al comparar conjuntamente los valores de sus parámetros b y d.

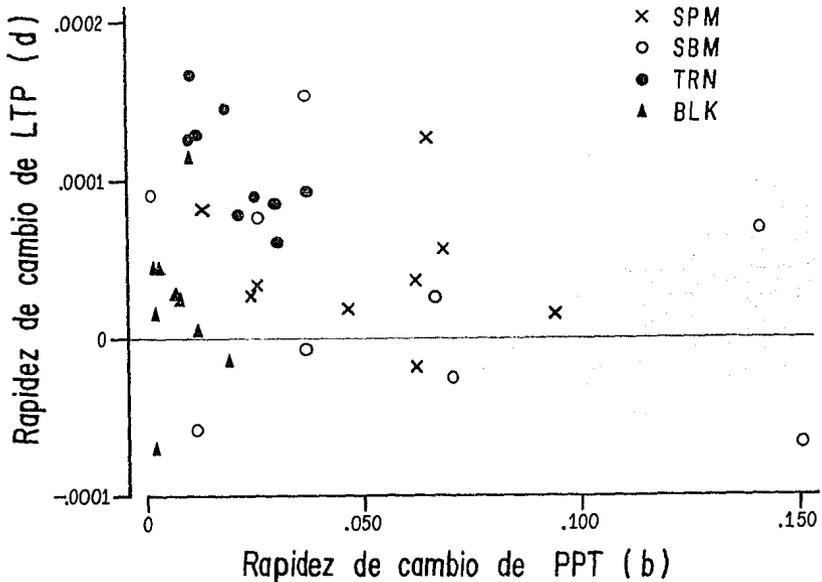


Fig 5. Gráfica de la dispersión de los parámetros b y d de la función $f(t)=pe^{-bt}+le^{-dt}$ ajustada a los datos de potenciación retardada de cada experimento. SPM, experimentos supramáximos; SBM, experimentos submáximos; TRN, experimentos de sección parcial; BLK, experimentos con bloqueo parcial. Se presenta un análisis bivariado aplicado a las diferencias de localización de cada punto. SPM vs SBM, $F=1.62$, $p>0.1$; SPM vs TRN, $F=7.1$, $p<0.01$; SPM vs BLK, $F=12.24$, $p<0.005$; SBM vs TRN, $F=3.83$, $p<0.05$; SBM vs BLK, $F=4.43$, $p<0.05$; TRN vs BLK, $F=19.7$, $p<0.005$.

En los experimentos del grupo TRN la rapidez de recuperación de la PPT fue de un orden de magnitud mayor que en el grupo BLK, aunque ligeramente más lenta que en los grupos SPM y SBM. En este grupo, por otra parte se encontró una recuperación de LTP mas rápida, la desaceleración que presentó fue intermedia entre el pequeño efecto observado en el grupo BLK y el efecto máximo que caracterizó a los grupos SPM y SBM.

Estos datos señalan de manera clara que el perfil del curso temporal de la PR a partir de la cima, en la condición supramáxima (SPM), se puede modificar al cambiar ciertas propiedades espaciales

y temporales de la descarga de impulsos condicionantes (experimentos del grupo TRN), o al reducir la densidad de algunas acciones sinápticas con bloqueo parcial nicotínico (grupo BLK). *Estos cambios del perfil de la PR indican sin duda la existencia de modificaciones en la eficacia sináptica como consecuencia del procedimiento experimental empleado.* La cursiva destaca la principal observación de este trabajo.

Tiempo de aparición de la cima

Regularmente los registros tomados después de aplicar el tren se obtuvieron a una frecuencia de 0.1 Hz. Por eso las medidas en el tiempo de aparición de la cima son necesariamente múltiplos de 10 s a partir del final del tren. El tiempo de aparición de la cima en cada experimento de las diferentes condiciones experimentales fue: SPM: los 9 alcanzaron la cima a los 10 s; SBM: 8 en 10 s y 1 en 20 s; TRN: 7 en 10 s, 1 en 20 s y uno en 40 s; BLK: 1 en 30 s, 2 en 50 s, 2 en 60 s y 4 en 90 s. La media (±E.E.) de estos valores se muestra en la Fig 6A. El tiempo de aparición de la cima guardó la siguiente relación entre los grupos $SPM < SBM < TRN < BLK$, con un retardo considerablemente mayor en el grupo BLK.

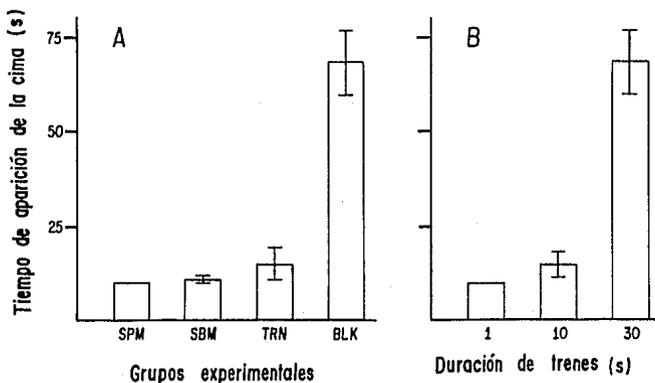


Fig 6. Tiempo de aparición de la cima de potenciación retardada. A. Efectos obtenidos después de la aplicación de un tren tetanizante de 24 Hz durante 30 s en las condiciones experimentales indicadas: SPM, experimentos supramáximos; SBM, experimentos submáximos; TRN, experimentos de sección parcial; BLK, experimentos de bloqueo parcial. B. Efectos en la condición BLK con trenes de la misma frecuencia aplicados durante los tiempos señalados en las correspondientes barras.

En vista del retardo mucho mayor obtenido en el grupo BLK se decidió investigar en esta misma condición experimental la influencia que sobre el tiempo de aparición de la cima tiene la duración del tren condicionante. Al efecto se realizó un grupo adicional de experimentos con bloqueo parcial. Aparte del grupo de experimentos con trenes de 24 Hz y la duración regular de 30 s se realizaron otros experimentos en los que se emplearon trenes de la misma frecuencia pero con duraciones de 1 (n=4) y 10 s (n=4). El curso temporal de la PR en estos experimentos fue similar al de la PR de experimentos con trenes de 30 s (Fig 7). Según puede verse en la Fig 6B el tiempo de aparición de la cima se redujo en cierta proporción con la disminución de la duración del tren.

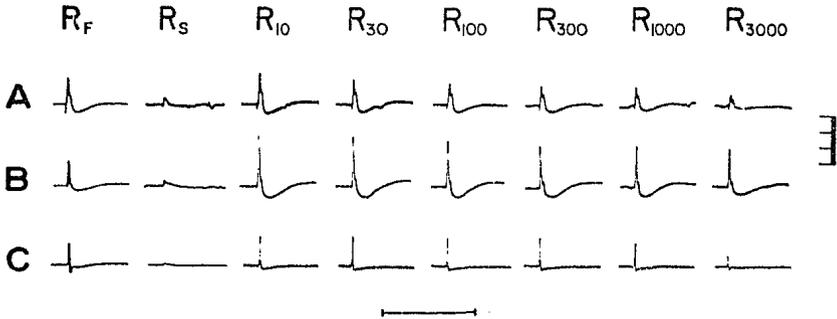


Fig 7. Ejemplos de potenciales de acción compuestos postganglionares provocados por pulsos cuadrados bifásicos de 0.2 ms y 0.1 Hz obtenidos de experimentos con hexametonio y tren tetanizante de 24 Hz aplicado a tres diferentes duraciones: A, 30; B, 10 y C, 1 s. Con la misma nomenclatura de la Fig 1, las columnas son R_F, primer registro experimental; R_S, registro obtenido 15 minutos después de la aplicación de hexametonio (2.25mg/kg), 20 minutos después de R_F e inmediatamente (10 s) antes del tren. De R₁₀ a R₃₀₀₀ son los registros obtenidos a diferentes tiempos según se señala con los números de los subíjios, después de terminado el tren. Calibración: Tiempo, 1 s; voltaje, 0.5 mV/división.

Estos resultados muestran que la etapa inicial de subida en el curso temporal de la PR puede ser influenciada por la distribución, tanto espacial como temporal de los impulsos de entrada. Es verosímil que los cambios observados se deban a alteraciones en la eficacia de la sinapsis ganglionar principal nicotínica, posiblemente por la ingerencia de algún mecanismo modulatorio, el cual pudiera variar según los procedimientos condicionantes aplicados en los diferentes grupos experimentales.

En 1952, ya Eccles había visto este perfil de PPT con subida inicial lenta en el ganglio simpático cervical superior *in vitro* del conejo cuando se bloqueaba parcialmente con d-tubocurarina. Este mismo

perfil de la PPT también lo encontró Christ (1980) en el ganglio estelar *in vitro* del hamster bloqueado parcialmente con hexamelenio. Por otra parte, es importante destacar que Briggs y col (1985a) seguramente no observaron este fenómeno debido a que la frecuencia de los estímulos de prueba postrén de 0.015 Hz (uno cada 60 s) que usaron no les permitió ver los cambios en la fase inicial ascendente de la PPT. Nuestros resultados, por consiguiente, se pueden equiparar a los datos obtenidos en las preparaciones *in vitro*.

Hemos visto además que el proceso de potenciación en ganglios con bloqueo nicotínico parcial es análogo al fenómeno de decurarización postetélica (restauración de la transmisión de placa neuromuscular) descubierto por Boehm en 1894 y más tarde analizado en detalle por Boyd (1932), Rosenbluth y Morison (1937) y Hutter (1952). Eccles (1952) indicó que el retardo en la aparición de la cima, así como la caída lenta del fenómeno de PPT, inducidos en el ganglio parcialmente bloqueado, es semejante al curso de la PPT inducida en ganglios no bloqueados con trenes de larga duración (más de 30 s), como puede verse en la Fig 6 del trabajo clásico de Larrabee y Bronk (1947). Esta observación es congruente con nuestros datos de correlación entre el retardo de la cima y la duración del tren condicionante en el grupo BLK. Cabe aclarar que este retardo en la aparición de la cima no es una característica exclusiva de los ganglios bloqueados; se encuentra en menor proporción en los experimentos de los grupos SBM y TRN.

Magnitud de la potenciación

La magnitud de la PPT y de la LTP, se estimó por los parámetros p y I respectivamente. La suma $p+I$ equivale a la cima o efecto máximo de potenciación y estima la cantidad de PR obtenida. El parámetro p sólo mostró una pequeña aunque significativa diferencia BLK < TRN. En cambio el parámetro I fue significativamente diferente en todas las comparaciones posibles con la siguiente relación de amplitud SPM < SBM < TRN < BLK (Fig 8), donde el grupo BLK fue notoriamente mayor a los otros tres. Al combinar estos parámetros p y I con el curso temporal, las diferencias en el comportamiento de los grupos de ganglios se hacen muy manifiestas (Fig 9). Son notorias las alteraciones que sufre el proceso

de LTP en relación al de PPT. Mientras que los cambios en PPT son muy pequeños, la LTP virtualmente ausente en SPM y escasa en SBM, se ve surgir en TRN y BLK, sobre todo en BLK a un nivel verdaderamente llamativo.

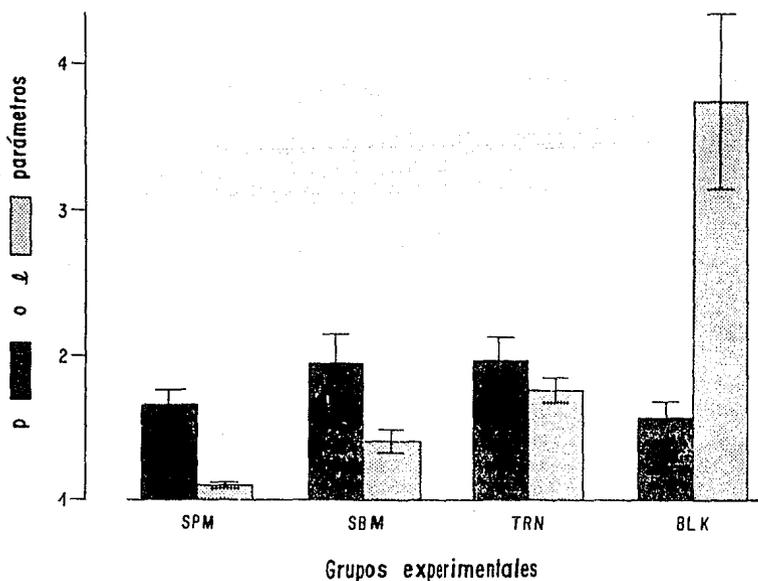


Fig 8. Amplitud de la potenciación posttánica (PPT) y de la potenciación de largo plazo (LTP) estimadas respectivamente por la media \pm E. E. de los parámetros p y l de la función $f(t) = pe^{-bt} + le^{-dt}$ ajustada a los datos obtenidos en las diferentes condiciones experimentales: SPM, experimentos supramáximos; SBM, experimentos submáximos; TRN, experimentos de sección parcial; BLK, experimentos con bloqueo parcial.

En el grupo BLK encontramos una relación entre la magnitud de la PR y la profundidad del bloqueo, medida esta última sobre la razón V_S/V_F . Mientras más se bloqueaba la transmisión ganglionar mayor fue la cantidad de potenciación. Se encontró potenciación aún cuando el bloqueo fue casi total: $V_S/V_F < 0.05$. Esta potenciación de ganglios con bloqueo profundo, también se encontró con los trenes de menos de 30 s de duración (Fig 7). Este tipo de relación entre la cantidad de PR y el valor de la razón V_S/V_F no se encontró en los grupos SBM y TRN.

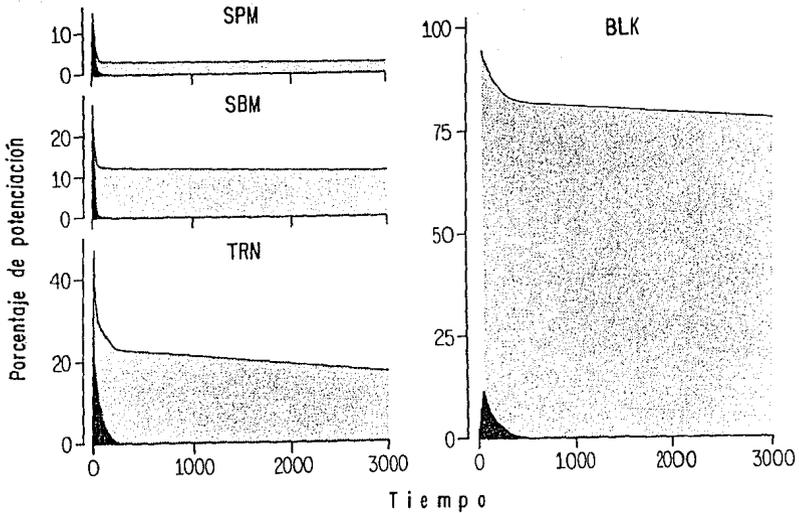


Fig 9. Amplitud de la potenciación retardada en las diferentes condiciones experimentales. Las curvas ilustradas son las funciones $f(t)=pe^{-bt}+e^{-dt}$ (curvas superiores) y $f(t)=pe^{-bt}$ (curvas inferiores) las cuales se ajustaron a las medidas del porcentaje de potenciación obtenido en los diversos grupos. SPM, experimentos supramáximos; SBM, experimentos submáximos; TRN, experimentos de sección parcial; BLK, experimentos con bloqueo parcial. En todos los casos el 100% es la media de las cimas de la condición BLK. Así, las ordenadas miden separadamente el componente PPT (áreas oscuras) y el LTP (áreas claras). Las diferencias entre los grupos son debidas, claramente, a cambios en el componente LTP.

Electos tetánicos

Los efectos tetánicos registrados durante la aplicación de un tren de 2.4 Hz durante 30 s se muestran en la Fig 10 y en la Tabla III. El patrón de respuesta general en los cuatro grupos, medido sobre la razón V_j/V_S , consistió en una subida debida a un primer efecto facilitatorio con el segundo y tercer pulso del tren, luego el valor V_j/V_S regresa cruzando la línea control hasta alcanzar sus valores menores con el último pulso intratren. A esta última respuesta intratren ($V_j=3D$ s) se le denominó "registro final". Al proceso de depresión se le ajustó razonablemente bien la siguiente función: $g(t)=qe^{-t/\tau_q}$.

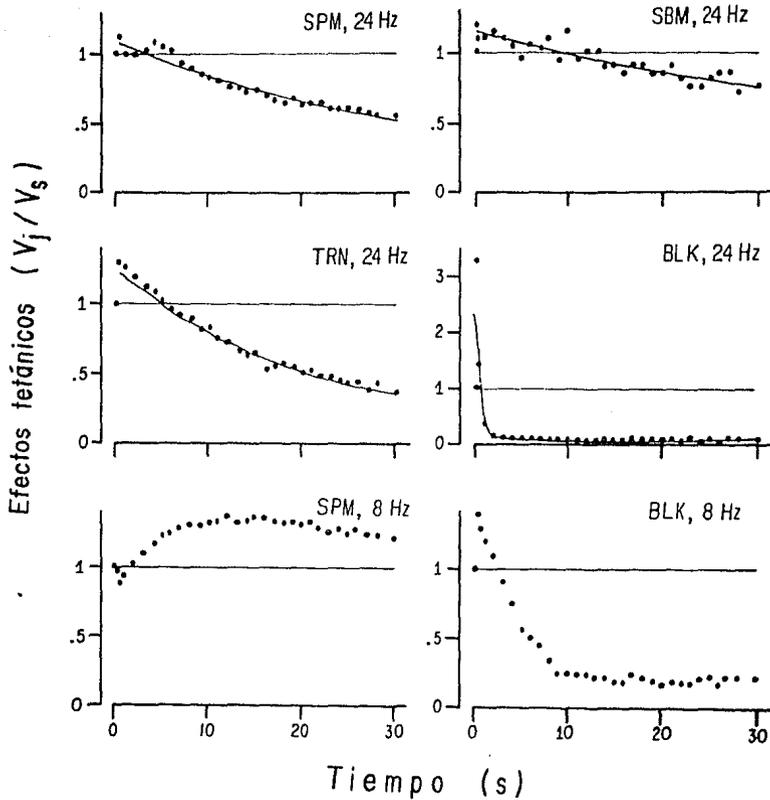


Fig 10. Ejemplos de cursos temporales del fenómeno potenciación-depresión registrados mientras se aplica un tren de pulsos al tronco simpático durante 30 s, a las frecuencias señaladas. Estos efectos intratén o tetánicos se midieron con el índice V_j/V_s , donde R_j es la amplitud de la onda S_2 del registro R_j obtenido al j -ésimo tiempo después del inicio del tren y V_s es la amplitud de la misma onda del primer registro tetánico (R_s). La función $g(t)=qe^{-t/\tau}$ se ajustó a los datos experimentales a partir de la cima de potenciación. SPM, experimentos supramáximos; SBM, experimentos submáximos; TRN, experimentos de sección parcial; BLK, experimentos con bloqueo parcial.

Tabla III. Media (\pm E.E.) de los efectos tetánicos.

Parámetros	Valores de los diferentes grupos experimentales					
	SPM	SBM	TRN	BLK		
q	1.02 \pm 0.03	1.28 \pm 0.06	1.27 \pm 0.07	2.41 \pm 0.32		
τ_q (s)	73.31 \pm 19.4	64.60 \pm 11.6	29.97 \pm 8.9	0.75 \pm 0.1		
registro final	0.61 \pm 0.08	0.79 \pm 0.05	0.40 \pm 0.10	0.03 \pm 0.01		
Comparaciones entre los grupos						
q	SPM < TRN < SBM < BLK		SPM < SBM	SPM < BLK	TRN < BLK	
	.010	.9	.014	.004	.007	.010
τ_q (s)	BLK < TRN < SBM < SPM		BLK < SBM	BLK < SPM	TRN < SPM	
	.014	.037	.710	.001	.009	.073
registro final	BLK < TRN < SPM < SBM		BLK < SPM	BLK < SBM	TRN < SBM	
	.008	.133	.095	.001	.001	.007

Los parámetros q y τ_q son de la función $f(q) = qe^{-(t/\tau_q)}$ ajustada a los datos experimentales. El registro final es la medida del último potencial intratén, $f(q)$, con $q=30$ s. Las comparaciones se hicieron con pruebas de t de Student.

La comparación estadística del valor de los diversos parámetros entre las cuatro condiciones experimentales se muestra en la Tabla III. La curva del efecto tetánico en el grupo BLK fue *sui generis*: el incremento inicial fue el mayor, la caída de depresión (τ_q) fue la más rápida (sólo 0.75 s) y alcanzó el nivel más profundo de depresión, casi hasta la extinción total de los potenciales hacia el final del tren (registro final=0.03). Desde este nivel de marcada depresión surgió el efecto de PR más amplio y duradero. En los otros tres grupos el curso tetánico no fue tan abrupto, y la diferencia entre ellos no fue tan marcada (Fig 10 y Tabla III). La cima del efecto facilitatorio inicial fue semejante en los grupos SBM y TRN y un poco menor en el grupo SPM. Las pendientes de caída (τ_q) de los experimentos de los grupos SPM, SBM y TRN no fueron significativamente diferentes; los grupos SPM y SBM fueron casi iguales, mientras que el grupo TRN mostró un curso ligeramente más rápido. En los tres grupos el registro final intratén tuvo un valor parecido, cercano a 0.6, aunque de este valor semejante surgieron diferentes máximos de PR.

Además de estudiar los efectos telánicos provocados por trenes de 24 Hz aplicados durante 30 s, se estudió un grupo adicional de animales para indagar los efectos telánicos a otra frecuencia, 8 Hz durante 30 s (Fig 10). En este conjunto de experimentos observamos el conocido fenómeno de reclutamiento en el grupo SPM, pero fue notable que en el grupo BLK el curso intratén se tornó en una predominante depresión como la que se ve en los experimentos de BLK con trenes de 24 Hz, sólo que, tanto la cima (q) como la constante de caída (τ_q) y el nivel máximo de depresión (registro final) fueron menores.

Estos resultados corroboran en lo general los estudios clásicos de Rosenblueth y Simeone (1938) quienes encontraron una leve diferencia en favor de experimentos con estimulación submáxima sobre experimentos con estimulación supramáxima en el efecto facilitatorio inicial. También Rosenblueth y Simeone observaron un proceso lento tardío de caída por debajo de los valores control, cuando aplicaban trenes supramáximos de frecuencia relativamente alta. Nosotros agregamos los datos que conciernen a una mayor potenciación y depresión en los experimentos de los grupos TRN y BLK. Bronk y col (1935) y de nuevo Rosenblueth y Simeone establecieron que la estimulación a baja frecuencia (2 a 8 Hz) no tiene efecto de depresión en la condición supramáxima sin bloqueo, sino que por el contrario produce una acción facilitatoria por reclutamiento. Nosotros confirmamos este dato y además encontramos que cuando el tren de baja frecuencia se aplica bajo la condición de BLK la acción facilitatoria de reclutamiento se torna en depresión. Esta última observación es muy significativa para el análisis de las hipótesis que son objeto de esta tesis (ver el Apéndice II).

Una segunda observación que surge de este trabajo es la interrelación entre los efectos de PR y los de potenciación-depresión intratén. Las diferencias encontradas de la PR entre los grupos son concomitantes con las encontradas en los efectos telánicos. Es notorio a este respecto, que los cambios, tanto en los efectos de PR como en los telánicos, son más marcados en la condición de bloqueo nicotínico, que cuando se reduce físicamente el número de fibras preganglionares activadas. La modulación nicotínica pareciera tener un mecanismo común para determinar los cambios que el ganglio presenta durante y después del tren condicionante.

Diferencias en la ultraestructura de las sinapsis

Como se mencionó en la sección de Método, el ganglio se fijó a los 3000 s del curso temporal de PR, lo que permitió comparar la ultraestructura entre las condiciones SPM y BLK precisamente en el momento en que las diferencias de eficacia sináptica entre ambas condiciones son muy notorias. Así, mientras que en SPM la PPT ha terminado mucho tiempo atrás y la LTP es apenas perceptible, en BLK si bien la PPT también ha desaparecido la LTP es aún de considerable magnitud.

En la Fig 11 se muestran tres micrografías típicas, una de cada grupo estudiado. No se encontraron diferencias significativas en la población de vesículas sinápticas por botón entre los tres grupos, (media±E.E.) Control 100.9 ± 10.8 , SPM 78.5 ± 5 , BLK 86.6 ± 6.2 . En cambio el número de vesículas adosadas a la zona activa fue diferente en los grupos según la siguiente relación significativa: Control < SPM < BLK (Fig 12A). Esta secuencia de diferencias también fue significativa cuando se comparó la densidad de vesículas adosadas, en referencia a la longitud de la zona activa (vesícula/ μm) y al área adyacente a la zona activa (vesículas/ μm^2) en una franja de 50 nm (diámetro de una vesícula, Fig 12B). Este último parámetro corresponde al "local vesicle packing density" de Wiley (Wiley y col, 1987). Por otra parte, la longitud de la zona activa en los diferentes grupos fue: Control $0.42 \pm 0.02 \mu\text{m}$; SPM 0.45 ± 0.02 y BLK 0.5 ± 0.02 con Control significativamente menor que BLK. Con un análisis de bivariación (Morrison, 1978) se compararon de manera asociada la cantidad de vesículas adosadas y la longitud de la zona activa. La comparación dió medias significativamente diferentes entre los tres grupos (Fig 12A).

Además de los cambios cuantitativos en vesículas y zona activa, se encontraron cambios en la distribución o acomodo de las vesículas en los botones presinápticos. En la condición de BLK fue posible distinguir un reacomodo de las vesículas en forma de cordones dirigidos perpendicularmente hacia la zona activa. Se sabe que las vesículas se dirigen hacia la zona activa a través de túneles formados por estructuras de proteína contractil llamadas proyecciones densas (Gray, 1962). Esta observación cualitativa también se determinó de manera cuantitativa a través del perímetro mínimo convexo, que como ya se dijo en la sección de Métodos mide directamente la extensión ocupada por las vesículas. De esta manera, las diferencias encontradas en este parámetro (SPM < Control = BLK, Fig



Fig 11. Imágenes típicas de las terminaciones en las sinapsis axodendrosomáticas del ganglio simpático cervical superior del gato bajo tres condiciones experimentales: Abajo, preparación control, sin tren ni hexametonio. En medio, cincuenta minutos después del tren (pulsos supramáximos de 0.2 ms a 24 Hz durante 30 s) en una preparación sin hexametonio. Abajo, cincuenta minutos después del tren en preparación tratada con hexametonio (2.25mg/kg). Calibración 1 μ m.

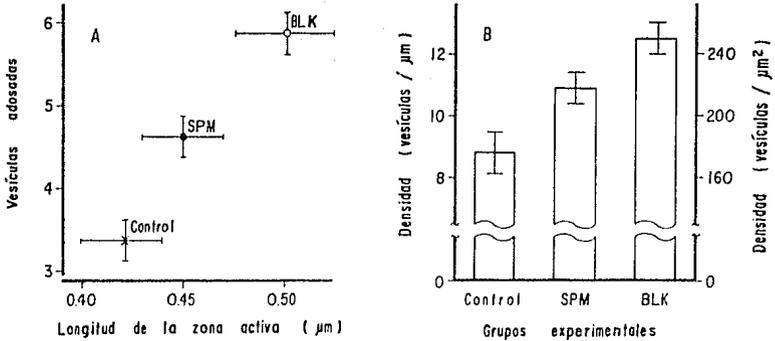


Fig 12. Cambios en las terminaciones presinápticas de las sinapsis axodendrosomáticas. Se compararon tres grupos experimentales: Control, experimentos sin tren ni hexametonio; SPM, cincuenta minutos después de una tetanización supramáxima a 24 Hz durante 30 s en preparaciones sin hexametonio; BLK, cincuenta minutos después de la tetanización en preparaciones con tratamiento de hexametonio (2.25 mg/Kg). A. La longitud de la zona activa (media±E.E.) en las abscisas se muestra asociada al número, en las ordenadas (media±E.E.) de vesículas adosadas. De acuerdo a un análisis bivariado las diferencias entre los grupos fueron: Control vs SPM, $F=8.07$, $p<0.005$; Control vs BLK, $F=26.16$, $p<0.005$; SPM vs BLK, $F=8.5$, $p<0.005$. B. Densidad de las vesículas adosadas expresado bien por unidad de longitud (µm) de zona activa, ya por unidad de área (µm²) en una región del largo de la zona activa y del ancho de una vesícula (50 nm) por encima de dicha zona activa ("local vesicle packing density" descrito por Wiley y col., 1987). De acuerdo a una prueba de t , los valores mostrados (media±E.E.) resultaron diferentes al menos a un nivel de significancia de 0.05 según el siguiente orden Control<SPM<BLK.

13) aunado a la similitud en la población vesicular, confirmó la observación de reacomodo de vesículas. Una posibilidad es que este alineamiento de vesículas se favorezca como consecuencia del tren tetanizante, y que sea mayor en la condición de BLK. En efecto, en SPM al empaquetarse las vesículas (disminución del perímetro mínimo convexo) se dificultaría la formación de nuevos túneles, mientras que con la expansión vesicular propia de BLK se propiciaría su aparición.

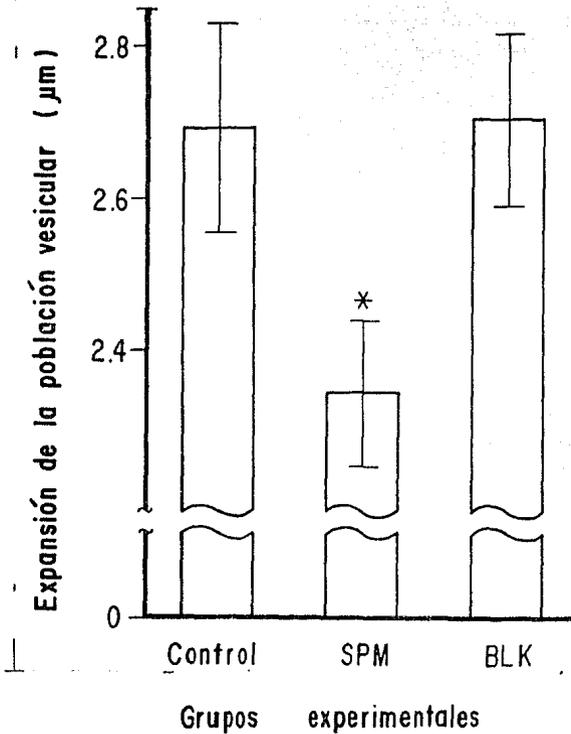


Fig 13. Medidas de la expansión de la población vesicular. Este parámetro se define como el mínimo perímetro de un polígono cuya área incluye todas las vesículas (ver Fig 3). Control, experimentos sin tren ni hexametonio; SPM, cincuenta minutos después de terminado el tren (supramáximo de 24 Hz durante 30 s); BLK, cincuenta minutos después del tren tetanizante en preparaciones tratadas con hexametonio (2.25 mg/kg). La relación entre los grupos fue $SPM < Control < BLK$. Una prueba de *t* mostró diferencias entre $SPM < Control$ con $p < 0.05$ y $SPM < BLK$ con $p < 0.025$.

Cabe mencionar con respecto a esta última parte de los resultados, que no existen en la literatura antecedentes de estudios ultraestructurales correlativos a la LTP en ganglio. En hipocampo se han reportado recientemente un par de trabajos de este tipo (Applegate y col, 1987; Applegate & Landfield, 1988), mismos que se comentan en la Discusión.

DISCUSION

Estudios de Electrofisiología

El resultado principal de este trabajo es que el curso temporal de la PR (medido en la onda S_2) varía característicamente según se estimule el total o sólo una fracción de las fibras aferentes o, si con estímulos máximos, se aplica ó no bloqueo parcial anticolinérgico nicotínico (hexametonio). Tanto la supresión de algunas fibras aferentes como el bloqueo, provocan un gran incremento del componente de la LTP. El surgimiento de la LTP fue especialmente marcado bajo el bloqueo parcial por hexametonio.

Se encontró además que también varía el curso temporal de la envolvente de las respuestas intratén de potenciación-depresión (también medido en S_2), con los mismos condiciones experimentales de tetanización. Al igual que en el curso de la PR, los cambios más notorios fueron en la condición de bloqueo parcial farmacológico.

Estos resultados demuestran que los cambios en la eficacia de la transmisión, medida por la descarga de impulsos y provocada durante y después de la administración del tren, son modulados por receptores presinápticos nicotínicos, como se anticipó en la Introducción de esta Tesis y en reportes preliminares (Morales y col, 1985; Morales & Alonso-deFlorida, 1988). Abajo se discute en detalle esta conclusión.

Así mismo es de importancia que la LTP aparece en la preparación *in vivo*, pues este fenómeno había sido observado *in vitro*, donde podía sospecharse que la anoxia y la baja temperatura fueran por si mismos factores significativos en los cambios observados por otros autores (Briggs y col, 1985a). Las condiciones particulares en las que se desarrolla la LTP explican de que un fenómeno tan notable hubiese pasado desapercibido en los extensos estudios clásicos (ver revisión de Rosenblueth, 1950).

Significado de los diferentes cursos temporales postrén e intratrén

Curso postrén. Para medir cambios en la PR se consideraron los siguientes parámetros: (1) el tiempo de aparición de la cima; (2) las pendientes de recuperación de los dos procesos PPT y LTP medidos a través de los valores de b y d respectivamente; (3) la amplitud de ambos procesos medida por medio de los coeficientes p y t ; y (4) la aparición de valles y oscilaciones. Para determinar adecuadamente la LTP fue necesario considerar conjuntamente los parámetros t y d o $1/d$. Las medidas de estos parámetros representan el número de neuronas (l) que descargan y el tiempo que se mantienen descargando ($1/d$ o τ). Por consiguiente y según la consideración conjunta de estos parámetros, en la condición de BLK, la LTP fue marcadamente mayor debido a un número grande de neuronas descargando ($l=3.74$) por un tiempo prolongado ($\tau=529.1$ minutos). Mientras que en la condición de SPM aunque el efecto de potenciación también fue prolongado ($\tau=320.21$ minutos), la cantidad de neuronas descargando fue mínima ($l=1.10$).

Como se resume en la Fig 9, otro resultado fundamental de esta tesis es el desarrollo diferente de la LTP según las distintas condiciones experimentales de activación. Mientras que en las condiciones de TRN y BLK la LTP fue de considerable magnitud, en las de SPM y SBM fue mínima o casi nula. A diferencia de estos notorios cambios en el desarrollo de la LTP, la PPT mantuvo una magnitud semejante en las diferentes condiciones de estudio. El incremento asimétrico de la LTP con respecto a la PPT no puede ser atribuido únicamente a un mero mecanismo de mayor eficiencia en la suma de los efectos postsinápticos por desaturación de la convergencia en las descargas aferentes (ver Apéndice I) como proponen Christ (1980) y Briggs y col (1985a). Según la hipótesis de LTP constante, propuesta por estos autores y mencionada en la Introducción, un mero mecanismo de incremento en la resolución de las medidas de potenciación implicaría precisamente un aumento proporcional y simétrico de ambos componentes PPT y LTP de la PR.

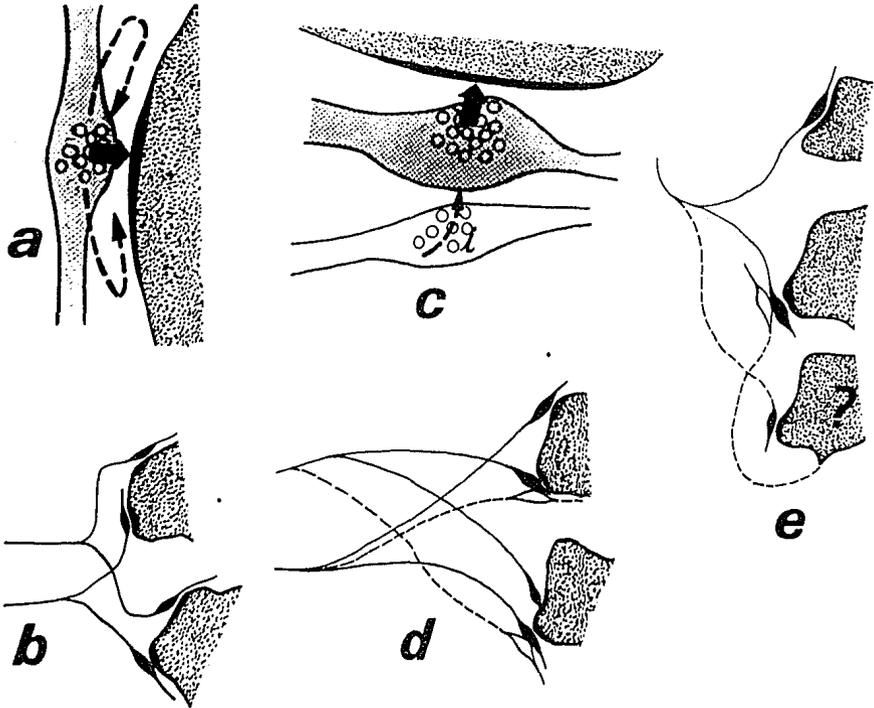
Ahora bien, en vista de que el desarrollo de la PPT y LTP en el ganglio autonómico del mamífero dependen de la eficacia presináptica (Collier y col, 1983; Briggs y col, 1985a; 1985b; 1988a; 1988b), todas las diferencias, encontradas en las distintas condiciones aferentes de tetanización, pueden atribuirse a

un efecto de modulación ejercida sobre los mecanismos de la terminación presináptica principal. Este tipo de modulación definido en la introducción se explica de la siguiente manera:

Junto a la conocida vía primaria preganglionar excitatoria (ver revisión de Rosenblueth, 1950 para la electrofisiología y Elfvín, 1963 para la ultraestructura), que está formada por botones terminales colinérgicos que hacen sinapsis con las neuronas ganglionares principales y que está mediada por receptores nicotínicos, existe una vía preganglionar secundaria de tipo inhibitorio que está formada por fibras preganglionares cuyos botones hacen sinapsis sobre los botones de la vía primaria y que también está mediada por receptores nicotínicos (Fig 14). Conforme a los resultados presentados aquí, esta vía secundaria tiene que ser inhibitoria, ya que su acción, ejercida plenamente en la condición de activación supramáxima (SPM), impide el desarrollo completo de LTP. La acción moduladora seguramente está mediada por receptores nicotínicos, ya que se puede bloquear selectivamente con sustancias antinicotínicas de gran especificidad como es el hexametonio. Así la supresión parcial de ambas vías, excitadora e inhibitoria, por el hexametonio o por la sección parcial del tronco preganglionar establece un nuevo balance entre inhibición y excitación en favor de la segunda; es decir que con estos procedimientos una gran proporción de terminaciones primarias excitadoras logran desinhibirse permitiendo la emergencia total del proceso de LTP.

El hexametonio provoca un doble efecto, por una parte bloquea la transmisión ganglionar excitadora por su acción sobre los receptores nicotínicos postsinápticos, y por la otra, tiene un efecto de desinhibición por el bloqueo sobre los receptores nicotínicos presinápticos. La vía inhibitoria parece ser mas sensible al efecto de bloqueo por hexametonio. Del mismo modo, la sección de un número de fibras aferentes (condición TRN) tiene dos efectos: Reduce la amplitud del potencial de acción compuesto por disminución de la excitación sináptica producido de la reducción en el número de botones excitados y disminuye la inhibición presináptica por supresión de vías secundarias, lo que resulta en el surgimiento de la LTP bajo una excitación espacial reducida. La sección parcial probablemente elimina más efectos inhibitorios que excitatorios. En las preparaciones supramáximas en cambio, las sinapsis inhibitorias presinápticas están

todas solivadas y por consiguiente se encuentra el máximo efecto de inhibición. En estas condiciones el perfil que la PR desarrolla está conformado por un notorio componente de PPT y un escaso componente de LTP.



Las condiciones de estimulación submáxima y sección parcial, al igual que el bloqueo, suprimen los efectos de las sinapsis axo-axónicas, pero a diferencia de éste no afectan a todas las sinapsis. En estas

preparaciones, puede haber una combinación de la población inhibida con la desinhibida, y según las características de esta combinación será la cantidad de LTP y la forma del perfil que se obtenga. Es notable sin embargo, la escasa cantidad de LTP obtenida en SBM comparada con la condición TRN, no obstante que la extensión en el impulso aferente fue igualmente reducida. Parece ser importante el tipo de axones involucrados en la transmisión del impulso preganglionar en cada una de estas condiciones: de bajo umbral en SBM y de diversos umbrales en TRN. Las fibras de bajo umbral suprimidas en la condición SBM, ejercen al parecer poca inhibición, mientras que en TRN se obtiene mayor desinhibición puesto que se suprimen fibras de diversos umbrales.

Los resultados obtenidos, así como su interpretación son consistentes con los estudios morfológicos de Elvin (1971) y Matthews (1983). Estos autores mostraron la existencia de las dos vías sinápticas ganglionares. Además de la vía excitadora (sinapsis axodendríticas y axo-somáticas) encontraron que algunos axones de las fibras preganglionares alcanzan otras terminaciones preganglionares con las que establecen sinapsis de tipo axo-axónicas. Elvin sugirió que estas sinapsis constituyen la base estructural de la inhibición presináptica nicotínica reportada por Koketsu y Nishi (1968). Se ve, por lo presentado en esta Tesis, que el significado de esta vía inhibitoria es más profundo, ya que tiene que ver con la regulación de la PPT y la LTP.

Cambios intratrén. Los parámetros empleados para determinar cambios en el curso temporal del fenómeno potenciación-depresión intratrén fueron: el coeficiente q que refleja la amplitud de la potenciación inicial, el exponente τ_q que indica la constante de tiempo de la depresión y el registro final que indica el grado de depresión encontrado. Se distingue una interrelación entre el curso de la PR y el de la potenciación-depresión intratrén.

Como en el efecto postrén, en el intratrén, sólo la condición BLK fue diferente a las otras condiciones en todos los parámetros estudiados. En cambio entre la SPM, la SBM y la TRN las diferencias fueron pequeñas y no en todos los parámetros. En los dos parámetros de depresión τ_q y registro final, la condición de TRN se alcanzó a diferenciar de las de SPM y SBM.

De acuerdo a las teorías prevalecientes (ver revisión de Emlakar, 1983) la secuencia de facilitación-depresión encontrada en la transmisión ganglionar durante la aplicación de un tren de alta frecuencia, se

debe a un balance de mecanismos opuestos en la presinapsis. Los resultados muestran que el hexamelenio actúa directamente sobre la presinapsis alterando dicho balance. Según se pudo constatar, el balance también se altera al variar la frecuencia de estimulación, así con 8 Hz por ejemplo, en SPM la depresión se torna en potenciación (debido al mecanismo de reclutamiento, descrito por Bronk y col, 1935 y Rosenblueth & Simeone, 1938). De nuevo, el hexamelenio también altera el balance propio de esta frecuencia ya que de potenciación la transforma en depresión.

Las pequeñas diferencias encontradas entre SBM y TRN se interpretan, al igual que en los efectos postrén, como que la inhibición ejercida por las diferentes fibras aferentes (o desinhibición al suprimirlas) depende del tipo de axones involucrados. Es decir que la condición de TRN es más efectiva para desinhibir que la de SBM, en cuanto se eliminan al azar fibras de diferente umbral.

Estudios de ultraestructura

Mención aparte merecen los estudios de ultraestructura pues demuestran de un modo directo la hipótesis de modulación avanzada en la introducción. La hipótesis presupone mecanismos presinápticos de inhibición y desinhibición, este último responsable, en el grupo BLK de la emergencia completa del proceso de LTP. Los resultados histológicos encontrados dan cuenta de ambos mecanismos, así como del balance entre excitación e inhibición presináptica. El hecho de investigar los cambios provocados por el tren a los 3000 s del curso temporal, permitió comparar las condiciones extremas de potenciación de BLK y SPM, en un punto en el que justamente en BLK aún persiste una considerable cantidad de LTP, mientras que en SPM, ésta casi se ha extinguido.

Los datos presentes de diferentes grados de facilitación en SPM y BLK se reflejan por la mayor cantidad de vesículas adosadas y el incremento en la longitud de la zona activa encontrados en BLK. Tomando en cuenta que el desplazamiento de las vesículas distantes hacia la zona activa se le considera parte del mecanismo de liberación de mediador (Quilliam & Tamarind, 1973; Applegate y col, 1987; Wiley y col, 1987), estos dos datos, mayor número de vesículas adosadas e incremento de longitud de la zona activa, son evidencias directas de un mayor y más prolongado efecto de facilitación en la condición de BLK.

Por otro lado estos efectos de potenciación prolongada de la condición de BLK van asociados a un reacondo de las vesículas distantes con respecto a la zona activa. Pudo distinguirse que las vesículas formaban cordones como si fueran filas de vesículas que corren hacia la zona activa. En SPM en cambio, no se encontró este reacondo. Es posible que la organización para la facilitación consista en que las vesículas se transporten a lo largo de túneles formados por las proyecciones densas de la zona activa. Un patrón semejante fue descrito por Applegate y Landfield (1988) en un trabajo de potenciación. Dicho patrón, encontrado durante la estimulación de alta frecuencia del hipocampo, lo denominaron "string-like pattern" y según los autores se correlaciona con la LTP.

En la condición control, al mantenerse la excitación en condiciones basales, el mecanismo inhibitorio no se hace presente. Esta condición pues, muestra una mínima cantidad de vesículas adosadas y una expansión normal del área ocupada por vesículas. En la condición SPM aumenta el mecanismo excitatorio como consecuencia de la aplicación del tren tetanizante, pero no llega a desarrollarse en toda su amplitud como para provocar la LTP, debido al surgimiento del mecanismo inhibitorio. Este nuevo balance entre excitación e inhibición se manifiesta en los resultados como un aumento discreto en el número de vesículas adosadas acompañado de una notoria reducción en la expansión vesicular. La inhibición se ejerce por el empaquetamiento o aglomeración de las vesículas (equivalente a menor área ocupada por vesículas sin cambio en el total de las mismas) lo que impide el libre flujo vesicular. Por último en la condición BLK también se incrementa la excitación, pero a diferencia de SPM se desarrolla plenamente sin ninguna restricción dando lugar a la LTP. Según la propuesta de que la inhibición se ejerce por el empaquetamiento vesicular, es de esperarse que en la condición de desinhibición propia de BLK, la expansión vesicular recupere los valores control, que fue justamente lo que se encontró. El resultado de esta disgregación o desinhibición presináptica es un notorio aumento en el flujo vesicular con el consecuente incremento en la cantidad de vesículas adosadas.

Una última consideración de los resultados ultraestructurales es que el crecimiento de la zona activa asociado al desplazamiento de las vesículas pudiera cooperar en el adosado de las vesículas, dando como consecuencia un incremento en la liberación de mediador. Sin embargo, el hecho de que la densidad de vesículas adosadas también aumente indica que el desplazamiento de vesículas es un

proceso de facilitación presináptica independiente del aumento de longitud de la zona activa; dicho de otra manera, se adosan más vesículas por unidad de longitud de zona activa.

LTP proceso rígido vs LTP proceso modulado

Según lo hasta aquí argumentado, se puede concluir que el curso temporal de la PR depende de las condiciones temporales y espaciales de la descarga aferente. Esta conclusión, sin embargo difiere de la de Christ (1980) y de Briggs y col (1985a). Christ sostiene que la PPT obtenida en preparaciones bajo bloqueo por hexametonio aumenta en amplitud sin alterarse su perfil, de tal forma que la PPT medida bajo la acción de hexametonio no refleja ningún cambio en la eficacia sináptica, adicional al provocado por el tren tetanizante, que pueda atribuirse al efecto del hexametonio. La mayor amplitud de la PPT sólo la atribuye a un aumento en la resolución de las medidas por cambios en los efectos de suma y desaturación postsinápticos (Apéndice I). Sin embargo, al interpretar sus resultados, Christ pasa por alto que la caída de la PPT bajo hexametonio es más lenta, según se puede ver en su Fig 4, situación que sólo puede explicarse por un efecto de modulación de la eficacia presináptica.

Por su parte Briggs y col (1985a) reportaron la ausencia de diferencias entre las pendientes de recuperación de las diversas condiciones experimentales estudiadas (submáxima, sección parcial y bloqueo parcial). Sin embargo, sorprendentemente estos autores presentan en su Tabla 1 diferencias que son significativas, al menos entre estimulación submáxima y sección parcial en el valor de la pendiente de recuperación de LTP (submáxima $\tau_1=29\pm 3$ minutos, sección parcial $\tau_1=52\pm 1$ minutos). No obstante que entre submáximo y bloqueo muestran pendientes semejantes (submáximo $\tau_1=29\pm 3$, bloqueo $=30\pm 3$) la comparación no es válida, ya que se usan tetanizaciones a diferente frecuencia, 20 Hz durante 20 s en submáximo y 5 Hz durante 20 s en bloqueo. Y como es sabido (Dunant & Dolivo, 1968 y los propios Briggs y col, 1985a) la LTP es un fenómeno dependiente de la frecuencia. Estas discrepancias encontradas en la literatura motivaron en parte el cauce de esta investigación.

Relevancia Fisiológica de la PR

El hecho de que la activación de todos los axones preganglionares induzca una potenciación breve, mientras que la activación de una fracción de axones provoque una potenciación de larga duración, sugiere que el ganglio simpático ejerce diversas formas o posibilidades de integración sobre sus efectores. Es de suponerse que los impulsos ganglionares de acción relativamente breve, como los que inducen la localizada y rápida contracción muscular lisa o secreción exócrina, sean más efectivos si se incrementa la eficacia sólo por un breve lapso en las sinapsis ganglionares. Por lo contrario, cuando el ganglio requiere de funciones de pequeña magnitud pero duraderas como es el caso de los efectos nerviosos tónicos, entonces puede aplicar mecanismos para lograr incrementos prolongados de su eficacia sináptica. Hipotéticamente, la inhibición y desinhibición presináptica sirven para modular este tipo de integraciones periféricas del ganglio autonómico.

APENDICE I

Principios de Fisiología ganglionar aludidos

(a) El potencial de acción compuesto de las fibras postganglionares es la respuesta a un pulso aplicado a los nervios preganglionares. Cualquiera de los componentes de este potencial (p.e. la onda S_2) es una medida del número de neuronas que responden precisamente en el tiempo en que se produce el componente escogido para medir.

(b) Cada neurona ganglionar hace sinapsis con múltiples terminales de axones que proceden de múltiples nervios preganglionares, a este arreglo se le denomina convergencia. La consecuencia de este arreglo es que al estimular simultáneamente un cierto número de axones preganglionares, cada neurona recibe acciones excitadoras (alicuantas* de transmisor liberado) a través de las sinapsis con los terminales procedentes de múltiples nervios preganglionares.

(c) La sinapsis ganglionar, al igual que las demás sinapsis químicas, tiene como función primordial transmitir los impulsos desde la terminal presináptica a la membrana subsináptica produciendo alicuantas de mediador químico. La efectividad o eficacia de una sinapsis es la capacidad que poseen en promedio las terminaciones para despolarizar la membrana postsináptica. Esta capacidad se puede medir directamente sobre la amplitud de los potenciales postsinápticos (epsp, McLaughlin, 1975).

*Se usa el término alicuanta (parte de un todo) para indicar que la cantidad de mediador liberado en cada terminal es parte de la cantidad total de mediador liberado en todas las terminaciones que convergen en una neurona determinada.

(d) Cada alicuanta de transmisor induce un cambio de despolarización parcial. Los diversos cambios parciales se suman para producir en cada neurona un efecto global de despolarización que, cuando alcanza un cierto nivel fijo, determina el disparo de uno o más potenciales de acción a lo largo del correspondiente axón postganglionar. Este fenómeno se denomina suma espacial de efectos (despolarizaciones) postsinápticas. El valor de despolarización necesario para que una neurona descargue se denomina umbral y se dice que toda neurona se encuentra en estado liminal cuando alcanza ese valor. Si la suma de efectos excede el umbral, se dice que la neurona está en un estado supraliminal y, si la suma queda por debajo del umbral, entonces se dice que está en un estado subliminal. El conjunto de neuronas en estado liminal o supraliminal se conoce como zona de descarga. La amplitud de las respuestas en el potencial provocado postganglionar es una medida de la zona de descarga. El conjunto de neuronas en estado subliminal se conoce como orla subliminal. Si todas las neuronas del ganglio estuvieran en la zona de descarga, diríase que hay saturación de la suma de efectos*. McCandales y col (1971) propusieron una manera de estimar la dinámica de la población neuronal a través de una curva de estímulo/respuesta o curva "input/output" (I/O). En esta curva, que tiene las mismas características de una curva dosis/respuesta, se grafica la cantidad de fibras de entrada despolarizadas (potencial de acción del nervio preganglionar) contra la cantidad de ramas de salida depolarizadas (potencial de acción del nervio postganglionar). Se puede ver en la curva una relación lineal hasta cierto valor del estímulo, a partir de este punto, aunque se aumente el estímulo la respuesta permanece constante con un valor máximo. Este techo de la curva representa el fenómeno de saturación descrito líneas arriba.

*Tal es el caso en el ganglio autónomo. A frecuencias menores de 20 Hz, se acepta que las neuronas ganglionares sean del tipo todo o nada, es decir, para que descarguen deben alcanzar un umbral, en el cual la neurona descarga sólo un potencial de acción (Bronk, 1939). En esto se diferencian de otras neuronas que siguen el principio de Granit (Granit, 1963a y b), es decir, una vez que se alcanza el umbral la neurona produce una descarga cuya frecuencia de potenciales de acción es una función de la depolarización producida.

(e) De la convergencia y de la suma espacial, se infiere que al estimular muchas fibras preganglionares simultáneamente se consigue que un conjunto de neuronas descarguen al alcanzar su umbral. El número de neuronas que descargan se reduce al disminuir el número de nervios preganglionares activados simultáneamente. Esto se consigue experimentalmente al administrar estímulos submáximos, o bien administrando estímulos supramáximos pero en un tronco preganglionar parcialmente seccionado, de modo que los potenciales de acción que transcurren por las fibras seccionadas no alcancen a llegar a la terminación presináptica. También puede conseguirse lo mismo reduciendo el número de acciones mediante bloqueo parcial farmacológico del ganglio. El resultado es disminuir la efectividad de las cantidades de transmisor sobre cada neurona.

(f) La potenciación que provoca un tren condicionante aplicado a las fibras preganglionares se debe, a que cada pulso de prueba aplicado a los nervios preganglionares después de terminado el tren libera una mayor cantidad de mediador en las terminaciones presinápticas involucradas (Erlkar, 1983). Este efecto determina a su vez una mayor despolarización en cada neurona ganglionar, las que cambian su estado de excitación de la siguiente manera: i) algunas de las que estaban en estado subliminal alcanzan su umbral y, por consiguiente pasan al estado liminal y así a engrosar la zona de descarga; ii) algunas de las liminales, pasan al estado supraliminal y quedan dentro de la misma zona de descarga y; iii) las supraliminales se mantienen en estado supraliminal aunque con mayor grado de despolarización y también quedan en la zona de descarga.

(g) Como ya se dijo, la amplitud de las respuestas provocadas por cada estímulo de prueba es una medida de la extensión de la zona de descarga, es decir del número de neuronas que descargan. La curva del efecto de potenciación contra el tiempo, representa la extensión de la zona de descarga a lo largo del tiempo. De este modo la amplitud de las respuestas que surge como consecuencia del tren condicionante, indica un aumento en la zona de descarga con cada estímulo de prueba subsecuente. La cima o efecto máximo de potenciación indica la máxima extensión de la zona de descarga conseguida a expensas de la orla subliminal; luego, a partir de esta cima, el efecto de potenciación decrece, lo cual representa el proceso de disminución progresiva de la zona de descarga hacia su tamaño original.

(h) Si antes de aplicar un tren se estimulan todas las fibras preganglionares los pulsos de prueba aplicados causan una respuesta cuya onda subliminal es pequeña y la zona de descarga es grande. En estas condiciones el ganglio se encuentra próximo a su valor de saturación. En efecto dada esta situación la mayoría de las neuronas alcanzan la zona de descarga por efecto de cada ráfaga de impulsos provocados por los estímulos únicos de prueba. El efecto de despolarización provocado por el aumento en la liberación de transmisor debida a un tren, produce sólo un pequeño incremento de la zona de descarga a dichos estímulos únicos.

APENDICE II

Modelo de los mecanismos de PPT y LTP ganglionar

Antes de describir el modelo, se revisan los datos de la literatura concernientes a la estructura y dinámica de la sinapsis ganglionar. La revisión se hace de acuerdo a los principales postulados de la teoría vesicular, la cual sostiene que la acetilcolina (ACh) se almacena y libera de las vesículas presinápticas, contrariamente a las teorías que apoyan la liberación de ACh directamente del citoplasma de la terminación preganglionar. Esta controversia puede encontrarse en algunos trabajos de revisión (Zimmerman, 1979; Cecarely & Hurlbut, 1980; Tauc, 1982).

Desde un punto de vista general existen tres consideraciones que favorecen la teoría vesicular. Primero, la teoría vesicular es consistente con los mecanismos generales de secreción; el material secretado se almacena y transforma en pequeños compartimentos de membrana limitante de los cuales se libera al espacio extracelular (Del Castillo & Katz, 1954; 1956). Segundo, como hemos mencionado, la liberación de ACh de las terminaciones se realiza de una manera estructurada, y la teoría vesicular presenta una situación biofísica ideal para la verificación experimental directa de estos patrones de liberación. Y tercero, la teoría cuántica de liberación de mediador se liga adecuadamente con la vesicular sin necesidad de introducir postulados *ad hoc* como sería la formación de canales específicos a la ACh (Tauc, 1982), los cuales no se sustentan en evidencia estructural alguna.

Sinapsis ganglionar.

El ganglio autonómico es una vía monosináptica formada por las terminaciones de los axones preganglionares que hacen sinapsis con las dendritas o los somas de las neuronas ganglionares. La sinapsis química ganglionar es colinérgica, y sus terminaciones se encuentran ocupadas por vesículas de aproximadamente 50 nm de diámetro (Elvin, 1963); se ha demostrado que estas vesículas contienen ACh (Wilson y col, 1973). De acuerdo a la teoría vesicular, la transmisión de impulsos a través de las sinapsis químicas se lleva a cabo de la siguiente manera: El arribo del impulso nervioso depolariza la terminación y

determina la entrada de Ca^{++} , el cual provoca la exocitosis de las vesículas y así la liberación de mediador. Ya liberado el mediador, la membrana vesicular se fusiona con la membrana plasmática de la terminación y luego las vesículas se reconstituyen mediante endocitosis (Del Castillo & Katz, 1954; 1956). Este proceso de exocitosis de las vesículas, incorporación a la membrana plasmática, restablecimiento por endocitosis y llenado ulterior de mediador, se conoce como ciclo vesicular (Heuser & Reese, 1973). El transmisor liberado se difunde a través de la hendidura sináptica (20 a 30 nm) hasta alcanzar los receptores subsinápticos. La interacción de mediador y receptor desencadena una depolarización cuyos efectos se revisaron en el Apéndice I de esta tesis.

Se sabe que las vesículas liberan el mediador en una región especializada de la membrana presináptica conocida como zona activa. La disposición de las vesículas en las terminaciones no es al azar, sino que obedece a cierto orden u organización; se alinean en dirección de la zona activa y así se disponen para la liberación (Pfenninger y col, 1969). Se ha encontrado que en la zona activa surgen unas estructuras de proteína contráctil conocidas como proyecciones densas que se extienden hacia el citoplasma de la terminación (Gray, 1963; Bloom & Aghajanian, 1968). En vista de que estas proyecciones se han encontrado rodeadas de vesículas, se propone que formen túneles por donde circulan las vesículas en su camino hacia la zona activa (Akert y col, 1972). Se ha propuesto además, que las vesículas se desplazan en los túneles por una interacción mecánica entre las proteínas de las proyecciones densas ("neurin") y de las membranas vesiculares ("stenin") semejante al mecanismo de actina-miosina de músculo (Berl y col, 1973). Para poder ver las proyecciones densas es necesario emplear técnicas de fijación y tinción especiales; con las técnicas rutinarias de fijación sólo se alcanzan a ver las vesículas alineadas en forma de cordones. Sobre la zona activa existen también unas macromoléculas que se cree son los sitios específicos del adosamiento vesicular. Se sabe además que estos sitios aparecen en dos configuraciones intercambiables, activada y desactivada, configuraciones que respectivamente permiten o no el adosado de vesículas (Pfenninger & Rovainen, 1974).

El modelo

El principal problema que debe resolver un modelo de potenciación ganglionar se resume en dos preguntas: ¿cómo a partir del fenómeno de potenciación-depresión intratérn segundos después (1 a 5 s) surge una considerable y prolongada potenciación? y ¿cómo, al desinhibir la terminación presináptica, surge una potenciación en otra escala de tiempo mucho más lenta (LTP) que la escala de la PPT? No hay duda que los mecanismos intra y postrén están ligados y, por consiguiente el modelo debe explicar ambos de un modo congruente y unitario. El modelo que se propone en efecto, responde ambas preguntas y explica lo que acontece en cada terminación presináptica ganglionar. A continuación se describen, primero sus componentes y luego sus mecanismos tanto en terminaciones presinápticas inhibidas como en desinhibidas:

Elementos del modelo. La terminación presináptica se puede considerar dividida en tres compartimentos de vesículas (Fig A. 1).

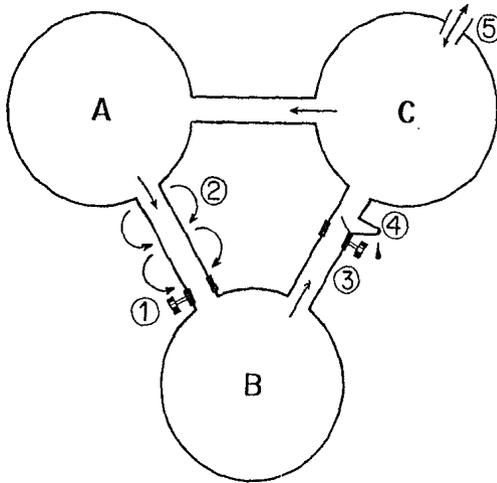


Fig A.1. Esquema de los compartimentos y flujos de las vesículas presinápticas en los botones terminales. Además de los tres compartimentos de vesículas A, B y C, se muestran: (1) la válvula A-B, (2) el peristaltismo del flujo A-B, (3) la válvula B-C, (4) el escape de mediador (liberación espontánea) y (5) el recambio de material proteico indispensable para mantener el ciclo vesicular.

Compartimento A: Lo forman las vesículas llenas de mediador situadas en los túneles de las proyecciones densas. Se considera que una vesícula deja A cuando entra en contacto con los receptores de la zona activa y así pasan al compartimento B.

Compartimento B: Son las vesículas adosadas a los sitios específicos de la zona activa. Permanecen en este compartimento hasta el momento de la exocitosis. Al fusionarse sus membranas con la plasmática se considera que las vesículas dejan el compartimento B y pasan al C.

Compartimento C: Incluye las vesículas incorporadas a la membrana plasmática más aquellas ya endocitadas pero que aún no se han introducido a los túneles de las proyecciones densas. En este compartimento se llenan de mediador y luego pasan al compartimento A (entran a los túneles) cerrándose así el ciclo vesicular.

La suma del número de vesículas de los tres compartimentos es constante ($N=A+B+C$). El contenido de vesículas difiere por compartimentos, C (≈ 7000) es muy grande, A mediano (≈ 300) y B pequeño (≤ 40). La marcada diferencia entre el contenido del compartimento C y el A establece un gradiente en el flujo C→A. El flujo A→B se debe al mecanismo activo de transporte de vesículas que se logra por la interacción entre las proteínas contráctiles de los túneles y las de la membrana vesicular, mecanismo que semeja un movimiento de peristaltismo de los túneles. El flujo B→C es un mecanismo activo debido a la exocitosis. En los flujos A→B y B→C existen sendas válvulas. Se designa a válvula AB a los sitios específicos de adosamiento de la zona activa con sus dos configuraciones activada y desactivada; y se designa válvula BC al propio mecanismo de liberación, tanto de liberación espontánea o escape ("leak") de quantas de mediador durante el reposo, como inducido por arriba de impulsos. El funcionamiento de esta válvula BC es independiente de la AB, es decir que el paso de B a C no depende del flujo A→B.

En condiciones de reposo existe un flujo estacionario de vesículas entre los tres compartimentos debido al escape que presenta el compartimento B. Este escape o liberación espontánea es el responsable de la aparición de los potenciales miniatura (mepps). El continuo desplazamiento vesicular a través del ciclo, provoca cambios pasajeros en los contenidos de los compartimentos. En el compartimento B los cambios se dan de la siguiente manera:

$$dB/dt = -B/(1+pB) + E(1+qB)A \quad (1)$$

donde $B/(1+pB)$ representa lo que pasa de B a C y $E(1+qB)A$ lo que llega a B de A. El parámetro B es la constante de tiempo del flujo B→C y $1+pB$ es un parámetro de saturación. Se propone que el vaciado de B es proporcional a su contenido hasta alcanzar cierto valor en que la función se satura de modo que aunque aumente el contenido, el vaciado permanece constante. El parámetro E es la constante de tiempo del flujo A→B, el término $(1+qB)$ representa un cambio cualitativo en el flujo A→B (ver más adelante la condición de desinhibición). Mientras la terminación se mantenga inhibida, $q=0$, y entonces el término (qB) se cancela. Por su parte el contenido del compartimento A varía de la siguiente forma:

$$dA/dt = \mu C - E(1+qB)A \quad (2)$$

donde el término μC es lo que llega a A de C y el término $E(1+qB)A$ lo que pasa de A a B. El parámetro μ es la constante de tiempo del flujo C→A. Dado que el contenido del compartimento A es mayor que el de B y que en reposo (válvula AB abierta) todo lo que sale de A pasa a B, la función de vaciado de B se puede considerar equivalente a la del llenado de A. Luego los cambios en los compartimentos se pueden condensar en las funciones de llenado y vaciado del compartimento A (Fig A.2). El llenado de A o vaciado de B, presenta una función logística con un nivel de saturación. La parte ascendente lineal de la curva se debe a que, dados contenidos pequeños de B, el vaciado de éste es proporcional a su llenado. A un determinado valor del contenido de B la curva se satura; es decir ya no aumenta el vaciado, aunque aumente el contenido. El vaciado de A se describe mediante la función de una recta con pendiente negativa pues todo lo que está en A tiende a vaciarse en B. Al graficar simultáneamente ambas curvas, llenado y vaciado de A, se determina el punto de equilibrio; es decir, un punto tal que lo que llega a A es igual a lo que sale ($dA/dt=0$). Este punto se marca con la letra (i) en la Fig A.2 y es la intersección de ambas funciones.

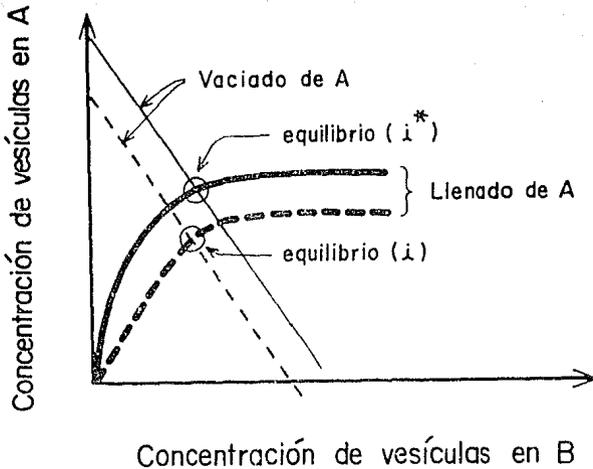


Fig A.2. Cinética lineal del flujo de vesículas presinápticas en terminaciones inhibidas. Se grafica el cambio de concentración de vesículas en A (ordenadas) en función del mismo cambio en B (abscisas). Se muestra el vaciado de A con líneas delgadas y el llenado de A con líneas gruesas. Se grafica la condición de reposo con líneas punteadas, y la condición de PPT con líneas continuas. Se muestra también los respectivos puntos de equilibrio (i) para reposo y (i^*) para la PPT.

Mecanismos de la terminación. Se describen dos tipos radicalmente diferentes de funcionamiento de la terminación presináptica según se encuentre inhibida o desinhibida. En la primera situación los cambios obedecen a una cinética de orden lineal que sólo permiten desarrollar fenómenos de facilitación en una escala breve de algunos minutos. En la segunda surgen alteraciones que convierten la cinética lineal a una no lineal; en efecto aparece una bifurcación, la cual da lugar, como un cambio cualitativo, a una nueva escala de tiempo larga, del orden de horas. A continuación se describen primero los mecanismos de la cinética de orden lineal propios de la condición inhibida y luego la situación de desinhibición con bifurcación.

Cinética lineal en las terminaciones inhibidas. La terminación presináptica sufre cambios de tipo lineal cuando se estimula con un pulso único ó con un tren de pulsos.

Cada impulso al llegar a la terminación promueve el paso de vesículas entre los tres compartimentos, alterando de manera pasajera el equilibrio de la condición de reposo. Cada impulso provoca un doble efecto: vacía a B por la liberación de mediador y estimula los flujos $C \rightarrow A$ y $A \rightarrow B$ durante 100 ms. El flujo $A \rightarrow B$

sin embargo perdura sólo 50 ms pues transcurrido este lapso, la válvula AB se cierra casi totalmente y permanece así durante otros 50 ms. Al reducirse la salida del compartimento A, dado que continua su llenado su contenido aumenta. A los 100 ms la válvula AB se abre de nuevo con lo que el contenido aumentado del compartimento A fluye hacia B provocando a su vez un aumento en B. Este aumento de B permite que el arribo de un impulso subsiguiente libere más mediador dando lugar a un efecto de facilitación. La recuperación de los valores iniciales en el contenido de B se da por el escape o liberación espontánea de mediador y dura aproximadamente un segundo.

Las curvas de facilitación (Larrabee & Bronk, 1947) se explican con este tipo de cinética. En efecto estas curvas muestran un incremento inicial con un primer pico a los 50 ms, un valle entre 50 y 100 ms, que según el modelo corresponde al cerrado de la válvula AB con la consecuente disminución en el contenido de B, una cima a los 110 ms y finalmente una pendiente de recuperación de aproximadamente un segundo.

La aplicación de trenes de 10 o más Hz (intervalos de 100 ms o menos) provocan una secuencia intratén de potenciación-depresión. El mecanismo de potenciación inicial se explica de manera similar que la facilitación a un pulso. La depresión se debe a que la válvula AB se cierra parcialmente y persiste la liberación o vaciado de B. Cada impulso subsiguiente encontrará la válvula AB semicerrada (número grande de sitios desactivados) por efecto del impulso precedente, lo cual determina la disminución en el número de vesículas en B y la consecuente disminución en la capacidad de liberación. Frecuencias menores de 10 Hz, cuyos intervalos son mayores de 100 ms, provocan un fenómeno de reclutamiento debido a que cada impulso arriba a la terminación cuando la válvula AB ya se abrió de nuevo, y por consiguiente siempre encontrará a B con mayor contenido.

La potenciación que se obtiene segundos después de terminado el tren se explica de la siguiente manera: Durante la aplicación del tren el contenido en el compartimento A aumenta debido a que disminuye su salida (semicerrado de la válvula AB) y persiste su llenado a través del flujo C→A. Cincuenta ms después del último pulso intratén, la válvula AB se abre de nuevo y entonces el contenido aumentado de A fluye libremente hacia B. Al igual que la facilitación por pulso único, la potenciación se debe al incremento

del contenido de B y así a una mayor liberación de mediador con cada pulso postrén subsiguiente. El tiempo que le toma al contenido de B retornar a sus valores de reposo es de 3 a 5 minutos.

Estos cambios en los flujos se reflejan en las curvas de llenado y vaciado de A graficadas en la Fig A.2. En la curva de llenado aumenta tanto la pendiente de subida como el nivel de saturación, ambos efectos resultan del aumento pasajero en el vaciado de B. La función de vaciado de A por su parte se retrasa. El resultado del desplazamiento de ambas funciones es la aparición de otro valor de equilibrio al cual denominaremos (\bar{i}^*), que sólo se mantiene mientras persiste el aumento de los flujos. Al restablecerse los valores iniciales del reposo en el contenido del compartimento B, en aproximadamente 3 a 5 minutos, las funciones vuelven a sus valores originales con la consecuente recuperación del equilibrio inicial (\bar{i}).

Terminación desinhibida y efecto de bifurcación. Además del mecanismo de aceleración provocado por los pulsos de estímulo, al desinhibir las terminaciones por supresión de la acción de las sinapsis exo-axónicas, se introduce un mecanismo de modulación presináptica. El efecto de la desinhibición o modulación presináptica es el aceleramiento del mecanismo peristáltico de los túneles, y el cerrado completo de la válvula AB. El primer mecanismo provoca la bifurcación y así la aparición de la escala larga, el segundo explica la mayor cantidad de potenciación inicial (cima) y la notoria depresión intratrén propias de la condición desinhibida.

La llegada de un impulso a una terminación desinhibida, al igual que en la inhibida tiene un doble efecto: vacía el compartimento B y aumenta los flujos C→A y A→B durante 100 ms. Pero a diferencia de la condición inhibida el cerrado que provoca en la válvula AB 50 ms después es *completo*. El resultado de estos cambios es un llenado inicial en B por el flujo A→B y un mayor llenado en A por el cerrado completo de la válvula AB. Al reabrirse la válvula el mayor contenido de A llena más a B.

Para que surja la bifurcación es necesario que llegue un tren de impulsos a la terminación. Al llegar el tren sus primeros pulsos provocan una facilitación intratrén mayor que la correspondiente a terminaciones inhibidas, debido al mayor incremento del contenido de B según se explicó en el párrafo anterior. Esta facilitación inicial se torna en un efecto de depresión que en menos de un segundo lleva a las respuestas intratrén a una virtual desaparición. Esta mayor y más rápida depresión se debe al cerrado completo de

la válvula AB. Al terminar el tren, el contenido de A está considerablemente aumentado, debido a la eliminación total de su vaciado (por el cierre de la válvula AB). A los 50 ms después del último impulso intrín se reabre la válvula AB con lo que el contenido aumentado de A pasa a llenar el compartimento B.

Al alcanzarse un cierto valor del llenado de B, se dispara una señal que acelera el peristaltismo de los túneles (corresponde a $q > 0$). El aumento del flujo A \rightarrow B (aceleramiento del tránsito de vesículas en los túneles) provoca un aumento en el llenado de A por encima del nivel de saturación establecido en condiciones de inhibición dado el aporte constante del flujo C \rightarrow A. Por otra parte, el vaciado de A se retarda precisamente por el aumento en su llenado.

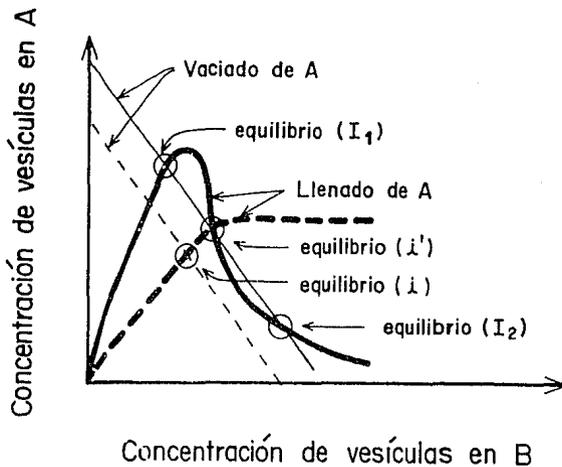


Fig A.3. Gráfica del cambio de cinética lineal a no lineal (bifurcación) de las vesículas presinápticas en terminaciones desinhibidas. Se compara el cambio de concentración de vesículas en A (ordenadas) en función del mismo cambio en B. (abscisas) Se muestra el vaciado con líneas delgadas y el llenado con líneas gruesas del compartimento A. Condición de reposo (antes del tren) líneas punteadas, condición de LTP líneas gruesas. Se muestran también los equilibrios (I) del reposo y los tres que provocan la bifurcación: el original (I') y los dos nuevos (I_1) situado en valores bajos de B e (I_2) establecido en valores altos de B.

Al aumentar el llenado de A su función cambia de la logística a una cúbica (debido a $q > 0$). La nueva forma de la función de llenado de A, y el desplazamiento de la recta de vaciado de A, dan lugar a tres puntos de intersección entre ambas funciones según se observa en la Fig A.3. La aparición de tres puntos

de equilibrio (las tres intersecciones) en lugar de uno, es lo que se considera *biturcación*. Estos puntos son: el original etiquetado como i' que corresponde al i^* de la condición inhibida y dos adicionales marcados como I_1 e I_2 .

Debido a la biturcación el equilibrio original (i') se hace inestable. Se dice que un fenómeno es estable cuando al perturbarlo regresa a su valor de equilibrio; e inestable quiere decir que cualquier perturbación lo alejara permanentemente de su punto de equilibrio. La velocidad con la que el equilibrio se recupera presenta pendientes positivas mientras que los alejamientos tienen pendientes negativas. Los cambios de estable (pendiente positiva) a inestable (pendiente negativa) llevan a la pendiente a pasar por cero, haciéndose muy pequeña al acercarse a este valor. Esta disminución de las pendientes a valores muy pequeños es la que provoca la aparición de escala de tiempo largas (horas en el caso de la terminación desinhibida biturcada). Al terminar el efecto del tren (algunos minutos) el sistema tiende a retornar al equilibrio original pero como ya no puede establecerse en él, porque se ha vuelto inestable, se establecerá en alguno de los dos nuevos. Y dado que el alejamiento del equilibrio o inestabilidad surgió por aumento en la concentración de B, el nuevo equilibrio escogido será el que corresponde a mayor concentración en B, es decir el equilibrio I_2 .

El establecimiento del sistema en el equilibrio I_2 se puede determinar en los registros globales del ganglio a través del parámetro l de la función de ajuste $f(t) = pe^{-bt} + le^{-dt}$. Como se mencionó en la Discusión, la l indica el número de neuronas que responden en un momento dado, mismo que depende del tamaño de las alicuentas que recibe cada neurona (ver Apéndice I) y el tamaño de las alicuentas está en función del número de vesículas adosadas (compartimento B). Por consiguiente la l mayor de la condición BLK confirma el nuevo equilibrio I_2 de valores altos de B.

Modelo y PR ganglionar. Las características de los componentes de la PR que se observan en los registros globales de la población ganglionar (potencial compuesto postganglionar) se pueden explicar en función de la cantidad de botones preganglionares que biturcan.

De manera general se considera que la PR tiene dos componentes uno temprano y breve la PPT y otro lento y tardío la LTP. Sin embargo cabe aclarar que la primera parte de la PR es estrictamente la suma de los dos procesos de potenciación el breve y el tardío. Después de un tiempo 3 a 5 minutos la

potenciación inicial desaparece, por lo que a partir de ese momento la PR está formada exclusivamente por el proceso lento tardío. Para determinar verazmente la cantidad de potenciación que corresponde a la PPT y a la LTP, es necesario obtenerla teóricamente a partir de la función de ajuste de la PR. En efecto en la función $f(t) = pe^{-bt} + le^{-dt}$, la primera exponencial ajusta a la PPT y la segunda a la LTP.

El efecto de potenciación que se desarrolla en las terminaciones presinápticas inhibidas (o aquellas no inhibidas pero incapaces de bifurcar) corresponde a la PPT. La LTP surge sólo en las terminaciones desinhibidas como resultado de la bifurcación, o bien en sinapsis capaces de bifurcar, aún cuando no tienen posibilidad ni de inhibición ni por ende de desinhibición.

En efecto, en el modelo se propone que no todos los botones preganglionares bifurcan. Los botones inhibidos por las sinapsis axo-axónicas (aproximadamente 1 de cada 5) son los que, al desinhibirse, logran bifurcar. El restante de la población de botones (aproximadamente 80%) que no presentan sinapsis axo-axónicas pueden ser de dos clases: una, muy numerosa, sin la capacidad de bifurcar (no cuentan con la capacidad aceleradora del peristaltismo de los túneles) y otra, de número reducido, con capacidad permanente de bifurcar (disponen de un aceleramiento permanente del peristaltismo de los túneles).

Las diferencias de la PR encontradas en las distintas condiciones experimentales estudiadas en esta Tesis, se explican por las diferentes combinaciones de los dos componentes PPT y LTP. Cabe recalcar que los cambios se dan primordialmente por diferencias en LTP y no en PPT.

En la condición SPM, casi toda la PR se debe a PPT es decir que $le^{-dt} \approx 0$. Esto se explica porque la gran mayoría de los botones presinápticos en esta condición de estimulación están inhibidos y por consiguiente no bifurcan. La pequeña cantidad de LTP presente en esta condición se debe al reducido número de botones con capacidad permanente de bifurcar. En BLK en cambio, la PR está formada principalmente por LTP, es decir que en esta condición se encuentra el mayor número de botones desinhibidos que bifurcan. Las condiciones de SBM y TRN se explican por situaciones intermedias,

La bifurcación sucede instantes después de terminado el tren, de tal manera que el explorar los ganglios a los 50 minutos postrén permite determinar las diferencias de ultraestructura de los botones con los equilibrios diferentes, según hayan o no bifurcado. Precisamente la condición BLK que cuenta con el mayor número de botones que bifurcaron y retornaron a un nuevo equilibrio, muestra un mayor contenido

en el compartimento A (más vesículas en los túneles de proyecciones densas) y en el B (más vesículas adosadas).

A este respecto, cabe aclarar que la media de un parámetro en la condición BLK (por ejemplo 8 en vesículas adosadas) no es la media de la población de botones que bifurcó, debido a que en la condición de BLK se encuentran botones de las dos clases que bifurcan y que no bifurcan. Por la misma razón las medias de la condición de SPM, no corresponden a las de la población de botones sin bifurcar. Resulta razonable proponer que la media de vesículas adosadas en los botones que bifurcan es mayor que la correspondiente de BLK; y que la de los no bifurcados es menor que la de SPM.

El aumento de potenciación encontrado en BLK, 4 veces mayor que en SPM, resulta del producto del aumento de vesículas adosadas (incremento de 1.0) multiplicado por 4.0 que es el número de botones convergentes que bifurcan (en total convergen 20 botones por neurona ganglionar, de los cuales 4 tienen la capacidad de bifurcar).

REFERENCIAS

- Arert, K., Pfenniger, K., Sandri, C. and Moor, H. (1972): Freeze-etching and cytochemistry of vesicles and membrane complexes in synapses of the central nervous system. In: *Structure and Function of Synapses*. Pappas, G.D. and Purpura, D.P. (Eds). New York. Raven. pp 67-86.
- Alonso-deFlorida, F., Cato, J., Ramirez, L. and Pardo, E. G. (1960). Effects of several blocking agents on the sympathetic and parasympathetic postganglionic action potentials. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **129**: 433-437.
- Alonso-deFlorida, F. Minzoni, AM, y Morales, M.A. (1987): Hacia un modelo de la potenciación postetélica y de la potenciación a largo plazo en el ganglio simpático. *Memorias del XXX Congreso Nacional de Ciencias Fisiológicas*. Resumen 141.
- Alonso-deFlorida, F. and Morales, M.A. (1989): Modulated long-term potentiation in the cat superior cervical ganglion *in vivo*. Enviado a publicación.
- Applegate, M.D., Kerr, D.S. and Landfield, P.W. (1987): Redistribution of synaptic vesicles during long-term potentiation in the hippocampus. *Brain Res.* **401**: 401-406.
- Applegate M.D. and Landfield, P.W. (1988): Synaptic vesicle redistribution during hippocampal frequency potentiation and depression in young and aged rats. *J. Neurosci.* **8**: 1096-1111.
- Bert, S., Puskin, S. and Nicklas, W.J. (1973): Actomyosin-like protein in Brain. *Science* **179**: 441-446.
- Bishop, G.H. and Heinbecker, P. (1932): A functional analysis of the cervical sympathetic nerve supply to the eye. *Am. J. Physiol.* **100**: 519-532.
- Birks, R.I. (1974): The relationship of transmitter release and storage to fine structure in a sympathetic ganglion. *J. Neurocytol.* **3**: 133-160.
- Bliss, T.V.P. and Lomo, T. (1973): Long-lasting potentiation of synaptic transmission in the dentata area of the anaesthetized rabbits following stimulation of the perforant path. *J. Physiol. (Lond.)* **232**: 331-356.

Bloom, F.E. and Aghajanian, G.K. (1960): Fine structural and cytochemical analysis of the staining of synaptic junctions with phosphotungstic acid. *J. Ultrastrut. Res.* **22**: 361-367.

Boehm, R. (1894): Einige Beobachtungen ueber die Nervenwirkung des Curerin. *Arch. Exp. Path. Pharmacol.* **35**: 16-22.

Boyd, T.E. (1932): Recovery of the tongue from curare paralysis following prolonged stimulation of the hypoglossal nerve. *Am. J. Physiol.* **100**: 569-575.

Briggs, C.A., Brown, T.H. and McAfee, D.A. (1985a): Neurophysiology and pharmacology of long-term potentiation in the rat sympathetic ganglion. *J. Physiol. (Lond.)* **359**: 503-521.

Briggs, C.A., McAfee, D.A. and McCaman, R.E. (1985b): Long-term potentiation of synaptic acetylcholine release in the superior cervical ganglion of the rat. *J. Physiol. (Lond.)* **363**: 181-190.

Briggs, C.A. and McAfee, D.A. (1988a): Long-term potentiation at nicotinic synapses in the rat superior cervical ganglion. *J. Physiol. (Lond.)* **404**: 129-144.

Briggs, C.A., McAfee, D.A. and McCaman, R.E. (1988b): Long-term regulation of synaptic acetylcholine release and nicotinic transmission: The role of cyclic AMP. *Br. J. Pharmacol.* **93**: 399-411

Brink, D.W. (1939): Synaptic mechanisms in sympathetic ganglia. *J. Neurophysiol.* **2**: 80-101.

Brink, D.W., Tower, S.S. and Solandt, D.Y. (1935): Synaptic transmission in the stellate ganglion. *Pro. Soc. Exp. Biol. Med.* **32**: 1659-1661.

Brown, T.H. and McAfee, D.A. (1982): Long-term synaptic potentiation in the superior cervical ganglion. *Science* **215**: 1411-1413.

Cannon, W. B. and Rosenblueth, A. (1937): The transmission of impulses through a sympathetic ganglion. *Am. J. Physiol.* **119**: 221-235.

Christ, D. (1980): Post-tetanic potentiation in ganglia which are blocked with hexamethonium. *Br. J. Pharmacol.* **69**: 249-255.

ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA

Ceccarelli, B. and Hurlbut, W.P. (1980): Vesicle hypothesis of the release of quanta of acetylcholine. *Physiol. Rev.* **60**: 396-441.

Collier, B., Kwok, Y.N. and Welner, S.A. (1983): Increased acetylcholine synthesis and release following presynaptic activity in a sympathetic ganglion. *J. Neurochem.* **40**: 91-98.

Del Castillo, J.B. and Katz, B. (1954): Quantal components of the end plate potential. *J. Physiol. (Lond.)* **124**: 560-573.

Del Castillo, J.B. and Katz, B. (1956): Biophysical aspects of neuromuscular transmission. *Frag. Biophys. Chem.* **6**: 121-170.

Dunant, Y. and Dolivo, M. (1968): Plasticity of synaptic functions in the excised sympathetic ganglion of the rat. *Brain Res.* **10**: 271-273.

Eccles, J.C. (1935). The action potential of the superior cervical ganglion. *J. Physiol. (Lond.)* **85**: 179-206.

Eccles, R.M. (1952). Action potentials of isolated mammalian sympathetic ganglia. *J. Physiol. (Lond.)* **117**: 181-195.

Elfvén, L.G. (1963): The ultrastructure of the superior cervical sympathetic ganglion of the cat. II. The structure of preganglionic end fibers and the synapses as studied by serial section. *J. Ultrastruct. Res.* **8**: 441-476.

Elfvén, L.G. (1971). Ultrastructural studies on the synaptology of the inferior mesenteric ganglion of the cat. *J. Ultrastruct. Res.* **37**: 426-431.

Erlukar, S.D. (1983): The modulation of neurotransmitter release at synaptic junctions. *Rev. Physiol. Biochem. Pharmacol.* **98**: 63-175.

Fisher, R.A. (1950): *Statistical methods for research workers.* Hafner. New York. 354 pp.

Granit, R., Kornell, D. and Lomårre, Y. (1966a): Algebraical summation in synaptic activation of motoneurons firing within the "primary range to injected currents. *J. Physiol. (Lond.)* **187**: 379-399.

- Granit, R., Kornhuber, H.H. and Mountcastle, V.B. (1962): Synaptic stimulation superimposed of motoneurons firing in the "secondary range" to injected currents. *J. Physiol. (Lond.)* 187: 401-415.
- Gray, E.G. (1963): Electron microscopy of presynaptic organelles of the spinal cord. *J. Anat.* 97: 101-106
- Heuser, J.E. and Reese, T.S. (1973): Evidence for recycling of synaptic vesicle membrane transmitter release at the frog neuromuscular junction. *J. Cell Biol.* 57: 315-344.
- Hollander, M. and Wolfe, D.A. (1973): *Nonparametric statistical methods*. Wiley & Sons. New York, London, Sydney, Toronto. 503 pp.
- Hutler, O.F. (1952): Post-tetanic restoration of neuromuscular transmission blocked by d-tubocurarine. *J. Physiol. (Lond.)* 118: 216-227.
- Kadota T. and Kadota K. (1982): Membrane retrieval by macropinocytosis in presynaptic terminals during transmitter release in cat sympathetic ganglia *in situ*. *J. Electron Microsc.* 31: 73-80.
- Koketsu, K. and Nishi, S. (1968): Cholinergic receptors at sympathetic preganglionic nerve terminals. *J. Physiol. (Lond.)* 196: 293-310.
- Koyano, K., Kuba, K. and Minota, S. (1985): Long-term potentiation of transmitter release induced by repetitive presynaptic activities in bull-frog sympathetic ganglia. *J. Physiol. (Lond.)* 359: 219-233.
- Larrabee, M.G. and Bronk, D. W. (1938). Long-lasting effects of activity on ganglionic transmission. *Am. J. Physiol.* 23: 126.
- Larrabee, M. G. and Bronk, D. W. (1947). Prolonged facilitation of synaptic excitation in sympathetic ganglia. *J. Neurophysiol.* 10: 139-154.
- Matthews, M.R. (1983): The ultrastructure of junctions in sympathetic ganglia of mammals. In L.G. Elfvig (Ed.), *Autonomic ganglia*. Wiley & Sons. New York. pp. 27-66.
- McCandless, D.L., Zablocka-esplin, B. and Esplin, D.W. (1971). Rates of transmitter turnover in the cat superior cervical ganglion estimated by electrophysiological techniques. *J. Neurophysiol.* 34: 817-830.

McLachlan, E.M. (1975): An analysis of the release of acetylcholine from preganglionic nerve terminals. *J. Physiol. (Lond.)* **245**: 447-466.

Morales, M.A. (1989): *Plasticidad en el ganglio autonómico*. Tesis recepcional de Maestría en Ciencias. Fisiológicas. UNAM. 52 pp.

Morales, M.A. and Alonso-deFlorida, F. (1988). Modulated delayed potentiation in the cat superior cervical ganglion *in situ*. *The Physiologist* **31**: A113.

Morales, M.A. and Alonso-deFlorida, F. (1989): Posttetanic potentiation in decentralized and nondecentralized superior cervical ganglion of the cat. *Bol. Est. Med. Biol.* (1989) en prensa.

Morales, M.A. and Alonso-deFlorida, F. (1989): Modulated tetanic spike response in the cat superior cervical ganglion *in vivo*. Enviado a publicación.

Morales, M.A., Merchant-Larios, H., Minzoni, A.M. and Alonso-deFlorida, F. (1989): Changes in synaptic-vesicle dynamics associated to LTP elicited under hexamethonium in the superior cervical ganglion of the cat. Enviado a publicación.

Morales, M.A., Soza-Bulnes, S. and Alonso-deFlorida, F. (1985): Post-train facilitation kinetics in the *in vivo* superior cervical ganglion of the cat. *The Physiologist* **28**: 328.

Morrison, D. F. (1978): *Multivariate Statistical Methods*. Tokyo: McGraw Hill International. 415 pp.

Nelder, J.A. and Mead, R. (1965): A simplex method for function minimization. *Computer Journal* **17**: 308-313.

Pardo, E.G., Cato, J., Gijón, E. and Alonso-deFlorida, F. (1963): Influence of several adrenergic drugs on synaptic transmission through the superior cervical and the ciliary ganglia of the cat. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **139**: 296-303.

Paton, W.D.M. and Zaimis, E.J. (1952): The methonium compounds. *Pharmacol. Rev.* **4**: 219-253.

Penninger, K. and Rovainen, C.M. (1974): Stimulation of calcium-dependence of vesicle attachment sites in the presynaptic membranes. A freeze-cleave study on the lamprey spinal cord. *Brain Res.* **72**: 1-23.

Pleninger, K., Sandri, C., Akert, K. and Eugster C.H. (1969): Contribution to the problem of structural organization of the presynaptic areas. *Brain Res.* **12**: 10-18.

Quilliam J.P. and Tamarind D.L. (1973): Some effects of preganglionic nerve stimulation on synaptic vesicle populations in the rat superior cervical ganglion. *J. Physiol. (Lond.)* **235**: 317-331.

Rosenblueth, A. (1950). *The transmission of nerve impulses at neuroeffector junctions and peripheral synapses*. New York. London: The Technology Press of Massachusetts Institute of Technology and John Wiley & Sons. 325 pp.

Rosenblueth, A. and Simeone, F. A. (1938). The responses of the superior cervical ganglion to single and repetitive activation. *Am. J. Physiol.* **122**: 688-707.

Sokal, R.R. and Rohlf, F.J. (1981). *Biometry*. Freeman, New York, 859 pp.

Soza-Bulnes, Morales, M.A. and Alonso-deFlorida, F. (1984): Efecto persistente de potenciación en el ganglio simpático cervical superior *in situ* parcialmente bloqueado por hexametonio en el gato. *Memorias del XXVII Congreso Nacional de Ciencias Fisiológicas*. Resumen 90.

Tauc, L. (1982): Nonvesicular release of neurotransmitter. *Physiol. Rev.* **62**: 857-893.

Trendelenburg, U. (1954): The action of histamine and pilocarpine on the superior cervical ganglion and the adrenal glands of the cat. *Br. J. Pharmacol.* **9**: 481-487.

Wilcoxon, F. (1945): Individual comparisons by ranking methods. *Biometrics* **1**: 80-83.

Wiley R.G., Spencer C. and Pysch J.J., (1987): Time course and frequency dependence of synaptic vesicle depletion and recovery in electrically stimulated sympathetic ganglia. *J. Neurocytol.* **161**: 359-372.

Wilson, W.S., Schulz, R.A. and Cooper, J.T. (1973): The isolation of cholinergic synaptic vesicles from bovine superior cervical ganglion and estimation of their acetylcholine content. *J. Neurochem.* **20**: 659-667.

Zimmerman, H. (1979): Vesicle recycling and transmitter release. *Neuroscience* **4**: 1773-1804.