

03068

2
rej.



*Universidad Nacional Autónoma
de México*

COLEGIO DE CIENCIAS Y HUMANIDADES
UNIDAD ACADÉMICA DE LOS CICLOS
PROFESIONAL Y POSGRADO

PLASTICIDAD EN EL GANGLIO AUTÓNOMICO

T E S I S

Que para obtener el Grado de
MAESTRO EN CIENCIAS FISIOLÓGICAS

presenta

MIGUEL ÁNGEL MORALES MENDOZA

INSTITUTO DE INVESTIGACIONES
BIOMÉDICAS

México, D. F.

TESIS CON
PUNTO DE CRUCE

1989



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis está 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.

PREFACIO

En los últimos siete años he trabajado sobre plasticidad en el ganglio autonómico. Este trabajo lo he realizado en la preparación del ganglio simpático cervical superior (gscs) in situ del gato desarrollado en este laboratorio. En terminos generales puedo considerar fructifera esta investigación, de ella, he logrado redondear varios trabajos, tres de ellos listos para ser enviados a publicación: i) Potenciación postetánica (PPT) en el gscs descentralizado y sin descentralizar; ii) Potenciación a largo plazo (LTP) modulada en el gscs in vivo del gato; y iii) respuesta tetánica modulada en el gscs in vivo del gato. Esta por terminarse uno mas, de microscopía electrónica sobre los cambios morfológicos sinápticos que acontecen en la LTP del gscs.

Así mismo, esta investigación ha dado lugar, tanto a esta tesis de Maestría como a una próxima de Doctorado. Esta tesis incluye la parte de descentralización y PPT, acompañado de un trabajo inconcluso sobre cambios plásticos del gscs como consecuencia de la estimulación eléctrica crónica reiterativa. En la tesis de Doctorado pienso incluir el estudio de la LTP, tanto en su efecto postrén o postetánico como intratrén o tetánico, además de los estudios de microscopía próximos a terminarse.

Tanto el trabajo experimental, desde el entrenamiento inicial en la técnicas de electrofisiología; como en el teórico, incluida la revisión bibliográfica, las discusiones y la elaboración del manuscrito; las realice en el Laboratorio de Biofísica del Departamento de Biomatemáticas de este Instituto de Investigaciones Biomédicas, bajo

la estricta y excelente asesoría del Dr. Francisco Alonso de Florida a quien le agradezco su dedicación y esmero, tanto en el trabajo que realicé como, especialmente, en mi formación académica.

Esta tesis no se hubiera realizado sin la valiosa colaboración de mis compañeros del laboratorio: Irma Rodríguez, Gabriela Sánchez-Mejorada y especialmente Sergio Soza Bulnes; así como de la desinteresada y entusiasta participación en el manejo estadístico y computacional de los datos, de mi hermano Luis Morales Mendoza. También agradezco el apoyo en la reducción a la Maestra Ana Luisa Guzman. A todos ellos mi más apreciado agradecimiento. Finalmente a los Doctores: Alejandro Bayón, José Luis Díaz, Augusto Fernández Guardiola y Enrique Hong su comentarios e indicaciones, así como su aceptación para fungir como sinodales en la defensa de esta tesis.

Miguel A. Morales Mendoza.

Enero de 1989

INDICE

	Pág.
RESUMEN	1
INTRODUCCION	2
CAPITULO 1. Efecto de descentralización	5
INTRODUCCION	5
METODO	9
Preparación <u>in situ</u>	9
Diseño experimental	11
Secuencia experimental	13
Medidas y estadística	15
RESULTADOS	17
Responsividad del ganglio simpático	17
Independencia de la terminación	17
Pendientes de recuperación	17
Area bajo la curva	21
Bloqueo y restitución de la transmisión	22
Tiempo de aparición de la cima	24
DISCUSION	26
CAPITULO 2. Estimulación eléctrica crónica	
del ganglio autonómico	29
INTRODUCCION	29
METODO	32
Electrodo	32
Diseño y elaboración	32
Implante	35

Técnica de estimulación crónica	37
Detección de posibles cambios plásticos	37
Durante la estimulación	37
En el registro agudo	38
RESULTADOS	39
Evaluación de la técnica experimental	39
Efectos de la estimulación	40
Cambios durante la estimulación crónica	40
Cambios en el registro agudo	42
DISCUSION	46
CONCLUSIONES	48
REFERENCIAS	49

RESUMEN

En la presente tesis se comunica una investigación acerca de algunos efectos plásticos en el ganglio autonómico, en particular en el ganglio simpático cervical superior (gscs) del gato. La tesis se divide en dos capítulos.

En el primer capítulo se estudia el grado de la autonomía de la terminación presináptica ganglionar en el desarrollo y mantenimiento de fenómenos facilitatorios de corto plazo, específicamente la potenciación postetánica (PPT). Se utilizó el gscs in situ, tanto con bloqueo parcial nicotínico como sin bloqueo, en dos condiciones experimentales: descentralizados por sección total de sus vías aferentes (nervio preganglionar) y con los ganglios normalmente conectados a sus centros. Los resultados no mostraron diferencias estadísticamente significativas, entre las preparaciones descentralizadas y no descentralizadas, lo que indica que la terminación presináptica ganglionar es autosuficiente para desarrollar el fenómeno de la PPT, y por consiguiente, la participación del soma y los flujos axónicos es despreciable.

En el segundo capítulo se estudian posibles cambios inducidos mediante la estimulación eléctrica crónica reiterativa del gscs. En la segunda parte del trabajo se desarrolló una técnica de estimulación eléctrica crónica reiterativa del ganglio simpático. Debido a ciertas dificultades de orden técnico, se logró obtener sólo resultados preliminares no concluyentes. Al parecer el ganglio simpático es susceptible de desarrollar cambios plásticos como resultado de la estimulación crónica. Hubo que suspender esta investigación debido a que las dificultades técnicas que surgieron requerían para superarse un consumo de tiempo mayor al prudente para completar un trabajo de tesis.

INTRODUCCION

El sistema nervioso tiene la capacidad de modificar su funcionamiento integral en una escala temporal breve y en respuesta a perturbaciones que se originan en el exterior. Estas perturbaciones dan origen a nuevos modos de integración neuronal que son perdurables y ordenados, de modo que determinan la adaptación del individuo viviente a su medio externo. Este fenómeno se denomina plasticidad.

La plasticidad se puede manifestar de diversas maneras, tales como el aprendizaje (Kornorsky, 1948), la adaptación de sistemas motores centrales a modificaciones provocadas en el sistema musculoesquelético (Kosak y Westerman, 1961; Guzmán-Flores y col, 1963), la recuperación de funciones mediante el rearreglo de circuitos neuronales después de lesiones al cerebro o nervios (Cotman y Nieto-Sampedro, 1982), la maximización de modalidades de percepción sensorial mediante el entrenamiento (Bach y Rita, 1969), el desarrollo de estados epileptoides mediante la activación cíclica de los circuitos (Alonso-deFlorida y Delgado, 1958; Goddard y col, 1969 and Louis y col, 1987), etc.

Los circuitos neuronales que surgen y que constituyen el cambio plástico pueden explicarse según dos diferentes mecanismos: a) modificaciones funcionales en la eficacia de determinadas sinapsis, con respecto a otras de la misma red (Forbes, 1922; Lorente de Nó, 1938); cambios en la estructura de circuitos debidos a la formación de nuevas sinapsis, con o sin supresión de otras, mediante el crecimiento y diferenciación de neuronas y sus elementos de transmisión de impulsos

(Ramón y Cajal, 1894; Hebb, 1949). El cambio ya sea meramente funcional o primordialmente estructural ha de producirse en un tiempo corto en relación a la duración del nuevo estado del circuito.

Un medio experimental de inducir la plasticidad en una red (circuito o módulo) neuronal es la activación repetida a través de sus vías aferentes. La repetición de los estímulos puede hacerse en una escala temporal relativamente breve ("escala rápida") como es el caso de la aplicación de un solo tren de estímulos, o bien en una escala temporal larga ("escala lenta") aplicando trenes repetidamente en periodos de minutos u horas durante días o semanas. La escala rápida da lugar a un fenómeno conocido como potenciación retardada (PR) que incluye dos componentes: la potenciación postetánica (PPT) y la potenciación de largo plazo (LTP)* (Bliss y Lomo, 1973; Briggs y col, 1985). En la escala lenta se tiene como resultado el desarrollo del efecto kindling (Alonso-deFlorida y Delgado, 1958; Goddard y col, 1969). En términos generales puede decirse que la potenciación retardada es un fenómeno relativamente simple de aumento de responsividad que tiene una duración pequeña (horas), mientras que el efecto kindling es un cambio complejo en la actividad oscilante de las redes neuronales, cambio que es permanente o de muy larga duración.

* En la presente tesis sólo se analizan aspectos concernientes a la PPT. Sin embargo, existen datos adicionales de nuestro laboratorio sobre el fenómeno completo de la PR es decir tanto de la PPT como de la LTP. Esos datos adicionales serán motivo de la tesis doctoral.

Según las teorías prevaletentes la PR se debe a un cambio de la eficacia sináptica, que acontece por un aumento de la habilidad de la terminación presináptica para producir y liberar mediador (Collier y col, 1983; Erulkar, 1985). Por lo que toca al efecto kindling en cambio, se ha postulado tanto cambios de eficacia sináptica, pre y postsináptica (Maru y col, 1982; Langmeier y Mares, 1984), como cambios en los circuitos debidos a crecimiento celular y establecimiento de nuevas sinapsis (Racino y Zaide, 1978; McIntyre y Wong, 1985).

La presente tesis se divide en dos capítulos. El primer capítulo se refiere a una investigación sobre el grado de independencia de la terminación presináptica para desarrollar el fenómeno de la PPT. El segundo capítulo se ocupa de indagar si el ganglio autonómico, en particular el simpático cervical superior del gato, es capaz, al igual que otras redes o núcleos neuronales, de desarrollar cambios plásticos por efecto de la estimulación eléctrica crónica reiterativa.

C A P I T U L O 1

Efecto de la descentralización

INTRODUCCION

La potenciación posttetánica (PPT) consiste en un incremento de las respuestas en las vías eferentes que se desarrolla durante algún tiempo (3-5 min) después de la aplicación aferente de un tren de pulsos de frecuencia relativamente alta (Hughes, 1958). Desde los trabajos clásicos de Cannon y Rosenblueth (1937), Rosenblueth y Simeone (1938), Bronk (1939) y Larrabee y Bronk (1938, 1947) se sabe que la PPT ocurre en el ganglio simpático, vía monosináptica formada por las neuronas preganglionar y postganglionar. Dado que la facilitación encontrada no resulta de cambios en la excitabilidad eléctrica de la neurona postsináptica, Larrabee y Bronk (1947) propusieron que la PPT reside en la terminación presináptica y que pudiera deberse a un incremento en la liberación de mediador. Actualmente esta explicación es de aceptación general tanto para el ganglio simpático como para otros sistemas (Birks, 1977; Kandel, 1977; Collier y col, 1983; Erulkar, 1985).

Una cuestión fundamental que queda por investigar es si la función de las terminaciones presinápticas (TP, normales sin efecto de degeneración) de las neuronas preganglionares no sólo están involucradas, sino que su operación es autónoma para mantener el total desarrollo de la PPT en el ganglio simpático; o si el soma de estas

neuronas preganglionares participa también en la integración de los mecanismos de la PPT.

Miledi y Slater (1970) han demostrado que la placa neuromuscular del diafragma de rata mantiene su capacidad para transmitir impulsos durante 8 ó 10 hrs después de la sección del nervio frénico a nivel del cuello. No se sabe sin embargo, si además de la habilidad para mantener la transmisión sináptica en las condiciones de reposo estudiadas por Miledi y Slater, la TP en el sistema neuromuscular o en el ganglio autonómico mantiene la capacidad para desarrollar fenómenos facilitatorios como sería el caso de la PPT. La condición de mayor demanda impuesta a la TP por la tetanización, pudiera reducir considerablemente la capacidad para generar la PPT después de la sección, aún cuando la degeneración walleriana no se haya desarrollado.

En condiciones normales de reposo los flujos axónicos son bastante lentos (17 mm/hr. Ochs, 1982) como para influir en el fenómeno de la PPT, el cual se desarrolla en pocos minutos. Además, estos flujos continúan localmente, como si fueran debidos a una cierta "inercia", durante algún tiempo después de la sección del axón (Ochs y Ranish, 1969). Estos hechos pudieran desalentar la suposición de que en el corto plazo la PPT pueda ser influenciada por la descentralización antes de que la degeneración walleriana se presente. Sin embargo consideraciones a priori como ésta, no quedan plenamente justificadas. Por una parte, los flujos axónicos pudieran ser influidos por el efecto mismo de la tetanización. (Geffen y Livet, 1977). Por otro lado,

resulta valido preguntarse si la sección por sí misma influye sobre la función de la TP. Se sabe que la sección del nervio provoca un incremento en la velocidad de los flujos axónicos anterógrados que puede llegar hasta dos veces el rápido y tres el lento (Grastein y Murray, 1969). Se ha sugerido que al seccionar los nervios, los flujos axónicos anterógrados y retrógrados se aceleran y así producen un depleción proteínica debido a la extravasación del axoplasma, la cual se "siente" como una señal en el cuerpo celular incitando modificaciones del metabolismo, principalmente de la síntesis de proteínas (Cragg, 1970). Cabe preguntarse entonces, si señales de este tipo no sólo viajan en sentido retrogrado sino que también lo hacen en sentido anterógrado y, al igual que en el soma, alteren el metabolismo de la TP incluidos los mecanismos de potenciación. Se ha encontrado asimismo un aumento en el transporte del mediador (acetilcolina) como consecuencia de la sección neuronal (O'Brien, 1978). Y, por último se ha sugerido que a través del sistema circulatorio, se transmite hacia el soma, una señal de la sección neuronal (Nittono, 1923); y uno pudiera pensar que de igual manera se transmita la misma señal hacia la terminación con la consecuente alteración de su funcionamiento.

Como una primera aproximación, y a modo de evitar cualquier efecto degenerativo de la terminación preganglionar se investigó el efecto de un tren aplicado inmediatamente después de descentralizar comparandolo con el efecto del tren aplicado en preparaciones sin descentralizar. En la mitad del número de las preparaciones tetanizadas se administró el antagonista nicotínico hexametonio hasta provocar un

bloqueo parcial (aproximadamente de 70 %) de la transmisión ganglionar. Se conoce que este agente nicotínico determina que la PPT se incremente en el ganglio simpático (R. Eccles, 1952; Christ, 1960; Morales y Alonso-deFlorida, 1988). Si la PPT obtenida en preparaciones con o sin hexametonio, resultara diferente en los ganglios con su inervación aferente intacta comparada con la obtenida en los ganglios agudamente descentralizados, podría inferirse que el soma de la neurona preganglionar regula la función facilitatoria de sus TP en el fenómeno de la PPT. En caso contrario, los resultados experimentales indicarían que las terminaciones presinápticas son autosuficientes para desarrollar el fenómeno de PPT. Ya hemos reportado algunos datos preliminares sobre esta línea de investigación (Morales, 1982; Soza-bulnes y col, 1985).

METODO

Preparación in situ

Se emplearon gatos adultos (*Felis domesticus*) de uno y otro sexo los cuales pesaban entre 2 y 3.5 Kg. Se usó anestesia general con clorolosa (hidrato de cloral 75 mg/Kg) por vía intraperitoneal, aplicada una hora antes de iniciar la cirugía. La temperatura corporal del animal se mantuvo colocándolo en una cámara para administrarle calor de manera regulada.

Se preparó al ganglio simpático cervical superior in situ para la estimulación en el tronco simpático y el registro en las raíces postganglionares. (Alonso-deFlorida y col (1960); Pardo y col, 1963). la cabeza del animal se sujetó en posición supina, mediante un dispositivo similar al de un aparato estereotáxico, fijándolo a través del maxilar superior y de los conductos auditivos externos. Se practicó una incisión longitudinal de aproximadamente 13 cm en la cara ventral del cuello. Se disecó por planos hasta llegar a tráquea la cual se seccionó y canuló. Luego de extirpar una porción de esófago, se alcanzaron los músculos prevertebrales, los cuales se separaron y seccionaron a nivel de su inserción en al axis. A continuación se localizó el ganglio cervical superior y el paquete nervioso formado por el vago, el ganglio nodoso, el nervio lingual y los nervios postganglionares carotideo interno y externo. De este paquete se disecaron los dos nervios carotideos. El tronco simpático cervical se disecó del paquete vasculonervioso del cuello en dos diferentes sitios:

a 6 cm del ganglio para instalar el electrodo de estímulo; y a 9 cm para realizar la descentralización en los experimentos que procede ejecutar la sección del nervio. Dos sitios separados es un circunstancia útil para evitar el movimiento del electrodo al ejecutar la sección del nervio. Las raíces postganglionares (nervios carotídeo interno y externo) se seccionaron a su entrada al cráneo por encima de la ampolla auricular. Se ató su cabo distal y se lesionó el extremo seccionado por machacamiento con unas pinzas finas. La disección de ambos nervios pre y postganglionar se hizo con cuidado de no dañar la circulación del ganglio. Al terminar estas maniobras, cada nervio se colocó en su respectivo electrodo.

El electrodo postganglionar consistió en dos placas de platino de aproximadamente 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 atado al nervio postganglionar. Se introdujo el nervio a la perforación tirando del hilo, de modo que quedara firmemente en contacto con las placas de platino, y que una de las placas quedara en contacto con su porción lesionada (la más distal al ganglio) y la otra con la porción intacta (la más proximal).

Como el de registro, el electrodo de estímulo consistió en 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

seccionario. Ya colocado el nervio en la ranura, ésta se rellenó con cera neurológica a fin de mantener al nervio en contacto estable con la superficie de los bordes de las placas.

Ambos electrodos se sujetaron con un dispositivo mecánico para evitar los desplazamientos que pudieran producirse durante las maniobras experimentales. Ya colocados los nervios en sus respectivos electrodos, se cubrió la preparación con aceite mineral, vaciándolo en una poza formada por los colgajos de piel.

Con esta técnica se obtuvieron registros muy estables debido a la alta y constante resistencia eléctrica en las superficies de contacto entre el nervio y las placas metálicas. Además se aseguró la constancia de la resistencia eléctrica durante todo el experimento mediante un dispositivo electrónico incuido en la unidad de aislamiento.

Mediante un estimulador Grass S4DR, su respectiva unidad de aislamiento, WP PC1, y el electrodo de estímulo, se aplicaron al tronco preganglionar pulsos cuadrados bifásicos de 0.2 mseg de duración a 0.1 Hz de frecuencia. Las respuestas obtenidas a través del electrodo de registro se amplificaron mediante un preamplificador extracelular Dagan 2400 y luego se derivaron a un osciloscopio Tektronix 5103N y se fotografiaron con una cámara Grass C4R.

Diseño experimental

Los experimentos se ordenaron en un diseño factorial para estudiar el efecto de tres factores (o variables independientes) sobre una

variable dependiente. La variable dependiente fue el cambio en función del tiempo, $f(t)$, de la altura del potencial de acción compuesto postganglionar, medido sobre la onda S_2 (J. Eccles, 1935). Los factores fueron tres: tren condicionante (pulsos supramáximos a 24 Hz durante 30 seg), descentralización y bloqueo parcial nicotínico con hexametonio. Este ordenamiento permite determinar el efecto de cada uno de los factores, así como el de todas sus posibles combinaciones. Cada uno de los tres factores se estudiaron a dos niveles. Un nivel es la aplicación y el otro la no aplicación del factor en cuestión (p. ej. tren o no tren, descentralización o no descentralización, etc.)

Al permutar ordenadamente los tres factores con sus dos niveles se obtienen las siguientes combinaciones: 1) no hexametonio, no descentralización y no tren ($\overline{H}\overline{D}\overline{T}$, cada letra indica la variable en cuestión: H, hexametonio; D, descentralización; T, tren; las barras indican negación); 2) no hexametonio, descentralización y no tren, $\overline{H}D\overline{T}$; 3) hexametonio, no descentralización, no tren, $H\overline{D}\overline{T}$; 4) hexametonio, descentralización y no tren, $H\overline{D}T$; 5) no hexametonio, no descentralización y tren, $\overline{H}\overline{D}T$; 6) no hexametonio, descentralización y tren, $\overline{H}DT$; 7) hexametonio, no descentralización y tren, $H\overline{D}T$; y 8) hexametonio, descentralización y tren, HDT . Cada combinación o grupo experimental contó con cinco réplicas, lo que que hizo un total de 40 experimentos. Los experimentos se realizaron en forma secuencial, ordenando uno de cada tipo (diferenciados por la combinación de los factores y sus niveles) y alternando sexo y lateralidad.

Secuencia experimental

Concluida la parte quirúrgica de la técnica y, luego de colocar los nervios en sus respectivos electrodos, se inició la estimulación basal con pulsos cuadrados bifásicos con duración de 0.2 mseg, frecuencia de 0.1 Hz e intensidad supramáxima (25% mas sobre la corriente que provocó una respuesta máxima). Después de estabilizada la preparación, se substituyó la frecuencia lenta de 0.1 Hz por un tren de 24 Hz de 30 seg de duración; al terminar el tren se restableció la frecuencia basal de 0.1 Hz, misma que se mantuvo por 60 min. Este primer tren, que se aplicó a los 40 experimentos, fue sólo para verificar el estado de la preparación.

La respuesta obtenida a los 2700 seg (45 min) después de terminado el primer tren, designada como R_F (Fig 1.1), marca el inicio real del experimento. Aproximadamente 5 min después se aplicó, a través de la vena safena derecha previamente canulada, 10 ml de sol salina a 37 C. En los experimentos correspondientes a bloqueo nicotínico (\overline{HDT} , \overline{HDT} , \overline{HDT} Y \overline{HDT}), se administró hexametonio (5 mg/Kg) diluido en la solución salina. En los experimentos sin bloqueo (\overline{HDT} , \overline{HDT} , \overline{HDT} y \overline{HDT}), sólo se administró solución salina. A los quince minutos se obtuvo el registro R_H (Fig 1.1) (entre 10 y 15 min tarda en estabilizarse el nivel de bloqueo). Inmediatamente después de R_H se realizó, cuando estaba prescrita por el diseño (\overline{HDT} , \overline{HDT} , \overline{HDT} y \overline{HDT}), la maniobra de descentralización en una región del nervio preganglionar situada a 3 cm caudalmente al sitio donde se instaló el electrodo de estímulo; esta maniobra consistió en la sección total del tronco

simpático cervical. En los experimentos sin descentralización, (\overline{HDT} , \overline{HDT} , \overline{HDT} y \overline{HDT}) se efectuó una maniobra similar (manipulación del nervio) sin seccionar. El siguiente potencial, R_S , se registró después de la maniobra de descentralización o su control (Fig 1.1). La medida

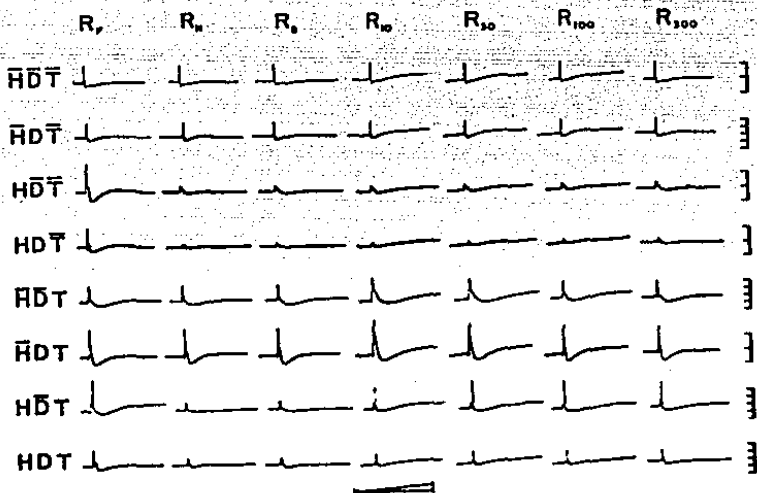


Fig 1.1 Potenciales de acción compuestos postganglionares provocados por pulsos cuadrados bifásicos de 0.2 msec aplicados al nervio preganglionar a diferentes tiempos y en diferentes condiciones experimentales según un diseño factorial de los experimentos. R_P : potencial provocado al inicio del experimento; R_H : potencial provocado 15 minutos después del R_P ; R_S : potencial provocado 30 seg después del R_H y justo antes (10 seg) de aplicar un tren tetanizante (24 Hz durante 30 seg). R_{10} a R_{200} son los potenciales provocados después de terminado el tren en el tiempo indicado en segundos por los subfijos. Se investigaron tres factores: una dosis (5 mg/kg) de hexametonio aplicada (H) o no (H) 5 minutos después de R_P ; el efecto de descentralizar (D) o no (D) 10 seg después de R_H ; y la aplicación (T) o no (T) del tren tetanizante. Calibración, tiempo 1 seg, voltaje 1 mV por división.

de S_2 en este registro se tomó como estándar para estimar los efectos posteriores al tren. Diez segundos después del registro R_S se aplicó, en aquellos experimentos prescritos (\overline{HDT} , \overline{HDT} , \overline{HDT} y \overline{HDT}), un segundo tren tetanizante de 24 Hz durante 30 seg. Los efectos producidos por este tren se utilizaron para medir la PPT producida. Al terminar el tren se restableció la estimulación con la frecuencia basal de 0.1 Hz la cual se mantuvo durante los siguientes 300 seg (5 min). Los potenciales obtenidos durante estos 300 seg se designaron como R_i , donde el subfijo representa el i-ésimo tiempo después de terminado el tren (Fig 1.1). En los experimentos prescritos como "sin tren" (\overline{HDT} , \overline{HDT} , \overline{HDT} y \overline{HDT}), la estimulación basal (0.1 Hz) se mantuvo sin cambios durante los últimos 1200 seg (20 min) experimentales.

Medidas y estadística

Las medidas de la variable dependiente se hicieron, como ya se mencionó, sobre la amplitud en mV de la onda S_2 del potencial compuesto postganglionar. Para evaluar el efecto del tren, las medidas se normalizaron con la siguiente función $f(t)=V_i(t)/V_S(t)$ donde $V_i(t)$ es la amplitud de la onda S_2 del potencial R_i obtenido en el tiempo i-ésimo después de terminado el tren y $V_S(t)$ es la medida correspondiente a la onda S_2 del potencial R_S obtenido justo antes de aplicar el tren. De ahí que $f(t)$ refleja los cambios de amplitud encontrados en función del tiempo y como resultado de la aplicación del tren. Los valores $f(t)$ mayores que 1 indican facilitación; igual a 1 significan que no hay efecto. En cada experimento la función se graficó entre los 10 y los

300 seg postrén.

Para medir el efecto de descentralización se usaron dos parámetros: uno que mide la pendiente del proceso de caída de las curvas generadas con los datos de cada experimento; otro que estima el efecto global. La pendiente se midió ajustando la función $f(t) = pe^{-(bt)}$ al proceso de caídas en las curvas. El efecto global se midió calculando el área bajo la curva hasta la línea control (valores de $f(t)=1$) y, desde el tiempo 0 (instante final del tren) hasta los 300 seg. Ambas medidas, pendientes y áreas bajo la curva permitieron compactar en un solo valor un proceso desarrollado en el tiempo. Los valores así obtenidos, dos por cada experimento, se agruparon según las diferentes combinaciones de los tres factores y sus dos niveles en los siguientes 8 grupos: \overline{HDT} , \overline{HDT} , \overline{HDT} , \overline{HDT} , \overline{HDT} , \overline{HDT} , \overline{HDT} y \overline{HDT} . Cada grupo quedó formado por los cinco valores para las pendientes y cinco para las áreas bajo la curva. A estos datos se les aplicó un análisis de varianza de tres factores con dos niveles y cinco réplicas (Snedecor, 1934; Zar, 1984).

RESULTADOS

Responsividad del ganglio simpático.

Cada pulso cuadrado bifásico con duración de 0.2 mseg aplicado al nervio preganglionar provocó un potencial de acción compuesto postganglionar monofásico, registrado en las fibras postganglionares, con el curso temporal típico descrito por Bishop y Heinbecker (1932) y por Eccles (1935) (Fig 1.1).

En aquellos experimentos en que no se administró hexametonio ni se aplicó el tren (\overline{HDT} y \overline{HDT}), la amplitud del potencial se mantuvo constante durante todo el tiempo experimental. El tren de 24 Hz aplicado durante 30 seg en las preparaciones sin bloqueo (\overline{HDT} y \overline{HDT}) provocó un incremento en la amplitud de los potenciales posttren con una cima o efecto máximo de 1.41 ± 0.03 (mediana e.e.) alcanzada a los 10 seg, y una recuperación a los valores control en aproximadamente 300 seg. En las preparaciones tratadas con hexametonio y tetanizadas (HDT y HDT), el tren provocó un efecto de potenciación de mayor amplitud y duración, con una cima de 3.97 ± 0.43 alcanzada a los 60 seg y una persistencia del efecto de potenciación más allá de los 300 seg (Fig 1.2).

Independencia de la terminación

Pendientes de recuperación

Como ya se dijo en la sección de "Método", la pendiente de restitución calculada desde la cima hasta los 300 seg (5 min) se determinó según la función $f(t) = pe^{-(bt)}$ donde el coeficiente p

representa el valor máximo de potenciación, y el exponente b expresa la pendiente. Para el análisis de varianza se decidió usar los valores de b en vez de los mas usuales valores de $1/b$ (constantes de tiempo) debido a que los primeros permiten comparar estadísticamente valores positivos con negativos. Los resultados dieron tanto pendientes positivas (grupos \overline{HDT} y HDT) como negativas (\overline{HDT} , \overline{HDT} , \overline{HDT} , \overline{HDT} , \overline{HDT} y HDT). No obstante en la tabla 1.2 se muestran los valores $1/b$ obtenidos con los medias de los valores de b mostrados en la tabla 1.1. En los experimentos sin tren, la función se ajustó a partir del primer valor postrón (10 seg). Los datos obtenidos al medir este parámetro fueron:

- a) los experimentos sin hexametonio y sin tren (\overline{HDT} y \overline{HDT}) dieron pendientes cercanas a 0, es decir que se mantuvieron paralelas al eje de las abscisas;
- b) los experimentos con hexametonio sin tren (\overline{HDT} y HDT) dieron pendientes pequeñas y positivas;
- c) los experimentos con tren y sin hexametonio (\overline{HDT} y \overline{HDT}) dieron pendientes negativas grandes;
- d) los experimentos con hexametonio y tren (\overline{HDT} y HDT) también dieron pendientes cercanas a cero, debido a que el efecto de potenciación se mantuvo casi constante (Fig 1.2).

En la tabla 1.1 se muestran las pendientes de los 5 experimentos que forman cada grupo. En la misma tabla aparecen los resultados del análisis de varianza. El principal resultado fue el efecto significativo del hexametonio sobre el proceso de caída de la PPT. Este efecto se reflejo por valores bajos de b asociados a una $F=24.35$ para el efecto del hexametonio, considerado como factor aislado (Factor H) y, $F=11.24$ para la interacción de los factores tren-hexametonio

(interacción HT). El primer dato probablemente refleja el fenómeno de recuperación del bloqueo por la excreción del fármaco (ver adelante), mientras que el segundo indica un genuino efecto sináptico del hexametonio sobre el fenómeno de PPT. La descentralización (Factor D, interacciones HD, TD y HDT) no causo ningún efecto significativo en los procesos de caída; después de la descentralización los valores de b fueron similares a los obtenidos en los ganglios no descentralizados independientemente de que hayan sido o no tratados con hexametonio.

Tabla 1.1 Procesos de caída de la PPT medidos por b de la función $f(t) = pe^{-(bt)}$

DATOS*				ANÁLISIS		
				EFFECTOS	F	SIGNIFICATIVO a 0.05 G.L.: 1, 32; F=4.15
\overline{HDT}	\overline{HDT}	\overline{HDT}	\overline{HDT}			
-0.01	-0.01	-0.33	-0.37			
-0.02	-0.001	-0.39	-0.50	H	24.35	SI
-0.005	-0.003	-0.53	-0.33	D	0.50	NO
-0.004	-0.002	-0.16	-0.65	T	54.06	SI
-0.005	-0.002	-0.47	-0.29			
				HD	0.29	NO
				HT	11.24	SI
				DT	0.01	NO
\overline{HDT}	\overline{HDT}	\overline{HDT}	\overline{HDT}			
0.02	0.11	-0.09	-0.07			
0.06	0.03	-0.07	-0.02			
0.02	0.05	-0.05	-0.15	HDT	0.01	NO
0.01	0.04	-0.07	-0.03			
0.04	0.10	-0.08	-0.005			

*Por conveniencia los datos se presentan como $b \times 10^3$.

Tabla 1.2 Promedio de las constantes de tiempo*.

\overline{HDT}	\overline{HDT}	\overline{HDT}	\overline{HDT}	\overline{HDT}	\overline{HDT}	\overline{HDT}	\overline{HDT}
189.39	462.96	55.55	25.25	4.43	3.89	23.14	30.30

*Los valores, expresados en minutos, se calcularon como $1/b$ de las b medias mostradas en la tabla 1.1

El efecto significativo del tren como factor independiente (Factor T) $F=54.06$ sólo puede tomarse como una medida control del desarrollo constante de la PPT y de la bondad del análisis de varianza como método estadístico.

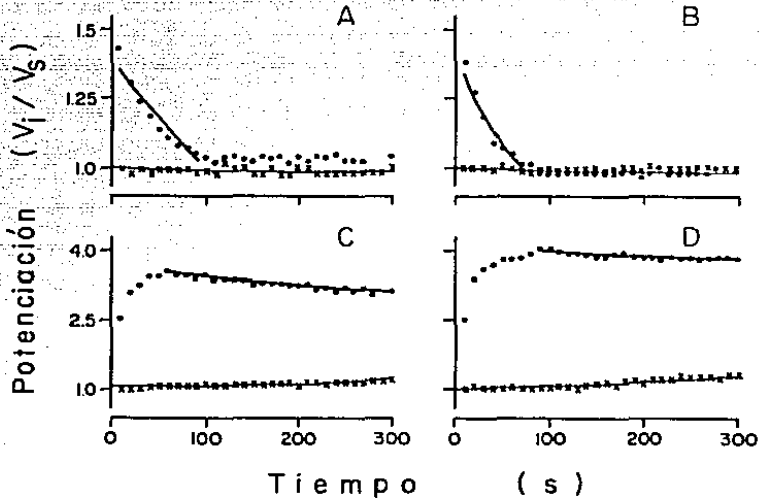


Fig 1.2 Ejemplos del curso temporal de la potenciación posttética bajo las diferentes condiciones experimentales investigadas. En cada pñel se grafican ejemplos de dos condiciones experimentales: aplicación al nervio preganglionar de un tren de 24 Hz durante 30 seg (-●-●-), y no aplicación del tren (-x-x-). Se muestra el ajuste a los puntos según la función $f(t) = pe^{-bt}$. Abscisas: tiempo en segundos, el tiempo cero corresponde al final del tren. Ordenadas: cantidad de potenciación medido según la normalización V_i/V_s donde V_i es la amplitud de la onda S_2 de los potenciales R_i y V_s es la amplitud de la misma onda en el potencial R_s . A: experimentos sin hexametonio, no descentralizados; B: sin hexametonio, descentralizados; C: hexametonio sin descentralizar; D: hexametonio descentralizados.

Área bajo la curva

Los experimentos sin tren, sin hexametonio, descentralizados y no descentralizados (\overline{HDT} y \overline{HDT}) dieron áreas = 300, debido a que los valores V_i fueron similares a V_S , es decir que $V_i/V_S=1$, y por consiguiente al multiplicar la unidad por los 300 seg del eje de las abscisas, resulta el valor de 300 para el área. En cambio, los experimentos con hexametonio sin tren (\overline{HDT} y \overline{HDT}) y los experimentos con tren (\overline{HDT} , \overline{HDT} , \overline{HDT} y \overline{HDT}) dieron áreas mayores que 300, debido a que la mayor parte de sus registros V_i fueron mayores que V_S .

Tabla 1.3. Área bajo la curva

DATOS*				ANÁLISIS SIGNIFICATIVO a 0.05 EFFECTOS F G.L: 1, 32; F=4.15		
\overline{HDT}	\overline{HDT}	\overline{HDT}	\overline{HDT}			
286.4	280.4	319.3	311.5			
287.1	295.3	297.9	302.7	H	46.78	SI
289.2	299.2	309.3	300.6	D	0.38	NO
293.6	293.8	331.2	302.8	T	38.04	SI
287.7	297.9	310.3	304.5			
				HD	0.43	NO
\overline{HDT}	\overline{HDT}	\overline{HDT}	\overline{HDT}	HT	34.42	SI
335.7	366.3	1720.4	1265.1	DT	0.18	NO
348.3	317.9	1050.6	1129.5			
319.0	381.9	972.6	1314.7	HDT	0.29	NO
352.3	359.1	485.0	1306.8			
342.9	368.4	777.2	662.8			

*Los registros se midieron durante 300 seg, según la normalización empleada, cuando $V_i/V_S=1$ no hay efecto. Por lo tanto, áreas=300 indican no efecto; áreas>300, incrementos; áreas<300 decrementos.

En la tabla 1.3 se muestra el área bajo la curva de los 5 experimentos de cada grupo, así como su análisis de varianza. Al igual que con el parámetro b, el principal resultado del área bajo la curva

fue el incremento que el hexametonio provocó sobre el efecto de potenciación del tren (interacción HT). El efecto de hexametonio se reflejó tanto como factor independiente (Factor H) $F=46.78$ como en su interacción con el tren $F=34.42$. Tampoco en el análisis de este parámetro se encontró significativo el efecto de la descentralización, ni de manera independiente (Factor D) ni en ninguna de sus interacciones (interacciones HD, DT y HDT). De nuevo, la significancia del efecto del tren (Factor T) $F=38.04$, sólo puede tomarse como una indicación del desarrollo constante de la PPT.

Bloqueo y restitución de la transmisión

La aplicación de una dosis única de hexametonio (5 mg/Kg) provocó un bloqueo parcial de la transmisión ganglionar que comenzó a manifestarse a los 30 seg después de iniciada su aplicación y se estabilizó 8 o 10 min después. El grado de bloqueo varió de experimento a experimento, la misma dosis provocó desde un 40% hasta un 95% de bloqueo. Una vez alcanzado este nivel, el bloqueo comenzó a eliminarse gradualmente hasta recuperar aproximadamente un 5% de la amplitud inicial, a largo de los 20 minutos siguientes. El proceso de restitución se ajustó adecuadamente con una exponencial positiva (Fig 1.2). Como ya se mencionó la descentralización no modificó este efecto de restitución.

Estos datos, en lo general concuerdan con el trabajo clásico sobre los compuestos bloqueadores ganglionares derivados del metonio de Paton y Zaimis (1952): i) el bloqueo por hexametonio empieza a

manifestarse segundos después de su ingreso al torrente sanguíneo y tarda varios minutos en alcanzar su nivel máximo de bloqueo; ii) la recuperación de la transmisión después del bloqueo, muy probablemente por excreción del fármaco, es rápida y consecuentemente el ganglio se mantiene poco tiempo (de 5 a 7 min) con un nivel constante de bloqueo. Aquí agregamos el dato de que la descentralización no modifica la sensibilidad del ganglio al efecto bloqueador del hexametonio.

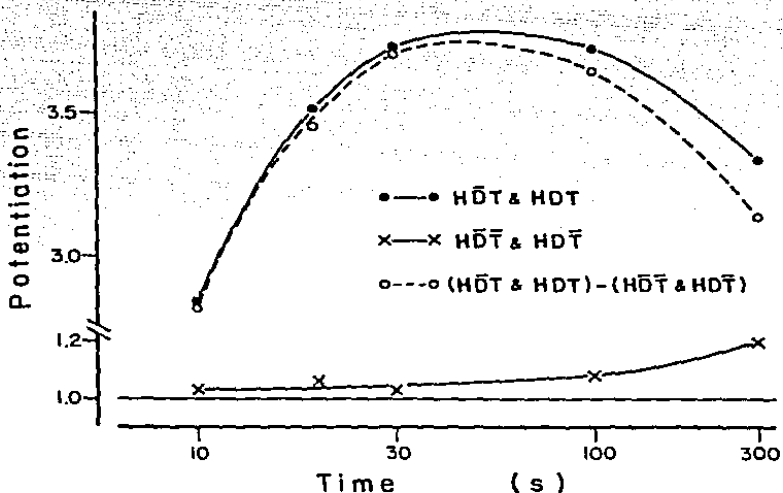


Fig 1.3 Medidas corregidas de PPT en preparaciones tratadas con hexametonio. Cada punto es la media (V_1/V_0) de 10 experimentos, 5 descentralizados y 5 sin descentralizar. Abscisas, tiempo en escala logarítmica de seg. Ordenadas, potenciación. Al substrair a estos valores (\overline{HDT} y \overline{HDT}) las correspondientes medias de los 10 experimentos no tetanizados (\overline{HDT} y \overline{HDT}) se obtuvo el valor corregido de potenciación o efecto genuino del tren tetanizante (-o-o-). El efecto de recuperación se muestra en los experimentos no tetanizados.

El curso del efecto postrén en las preparaciones parcialmente bloqueadas (\overline{HDT} y HDT) involucra dos procesos, el efecto mismo del tren y el efecto de recuperación del bloqueo. Para poder obtener el efecto neto del tren, a la media del curso temporal postrén se le resta la media del curso temporal de recuperación de bloqueo (Fig 1.3). De esta manera se obtuvo el efecto genuino de la PPT. De hecho, al comparar estas curvas con las obtenidas en las preparaciones semejantes de bloqueo y tren pero nefrectomizadas, es decir en aquellas que no existe efecto de eliminación pasiva, no se encontraron diferencias significativas $t=0.43$, $p=0.67$.

Tiempo de aparición de la cima

Un resultado inesperado fue el desplazamiento de la cima, (efecto máximo de potenciación) en los ganglios con hexametonio. Los ganglios tetanizados sin hexametonio (\overline{HDT} y \overline{HDT}) presentaron invariablemente sus cimas a los 10 seg, mientras que en los ganglios tetanizados y tratados con hexametonio (HDT y HDT) la cima se encontró en diferentes tiempos desde 20 hasta 90 seg (Fig 1.2). En la tabla 1.3 se muestran los valores de todos los experimentos de cada grupo así como el análisis de varianza. El efecto significativo del hexametonio (Factor H, $F=60.53$) indica una acción antinicotínica diferente de la conocida de bloqueo postsináptico. Al estudiar este parámetro tampoco se encontró significativo el efecto de descentralización, ni como factor independiente (Factor D) ni en su interacción con hexametonio (Interacción HD).

Tabla 1.3 Tiempo de aparición (múltiplos de 10 seg) de la cima.

DATOS				ANALISIS		
				EFFECTOS	F	SIGNIFICATIVO a 0.05 G.L: 1, 16; F=4.49
\overline{HD}	\overline{HD}	\overline{HD}	\overline{HD}			
10	10	40	70	H	60.53	SI
10	10	90	90	D	0.01	NO
10	10	40	40			
10	10	60	20	HD	0.01	NO
10	10	50	60			

DISCUSION

Por los datos obtenidos en este trabajo, tanto en las pendientes como en el área bajo la curva, podemos sostener que la descentralización o sección total del nervio preganglionar no provocó cambios sustanciales ni en la transmisión normal, ni en la recuperación del bloqueo farmacológico, así como tampoco en el efecto facilitatorio inducido por un tren condicionante. De los resultados se puede concluir que el efecto de PPT se logra sin la participación del soma neuronal; es decir, que al menos en el caso de las neuronas preganglionares simpáticas las terminaciones son autónomas para desarrollar los mecanismos responsables del fenómeno de potenciación. Esta autonomía es manifiesta, al menos durante el tiempo que dura el efecto de potenciación, alrededor de 5 minutos, lapso lo necesariamente breve como para evitar cualquier efecto de degeneración walleriana. Miledi y Slater (1970) demostraron en la placa neuromuscular que la terminación nerviosa puede mantener, en condiciones normales de reposo, la transmisión sináptica hasta por 8 horas después de efectuada la sección del nervio. Los resultados en ganglio simpático aquí presentados, muestran que la terminación presináptica también puede seguir funcionando normalmente durante el tiempo que dura el efecto de potenciación, a pesar de las condiciones de mayor demanda impuestas por el tren tetanizante.

Los datos de este trabajo descartan también que la sección por sí misma provoca modificaciones en la microfisiología de la TP, al

menos en lo que a los mecanismos de la PPT respecta. Una cuestión no abordada en este trabajo y pendiente por investigar, es la influencia de la degeneración walleriana en el curso de la PPT. Dicho de otra manera, es necesario investigar que tanto tiempo después de la sección, la TP puede no sólo mantener la transmisión sináptica en estado basal, sino también la capacidad de desarrollar estados de facilitación sináptica.

Con los datos de esta tesis, se descarta la participación del soma y parte del axón en los fenómenos facilitatorios de corto plazo. Aunque el soma y los flujos axónicos pudieran participar en fenómenos plásticos, pero de muy largo plazo. Así por ejemplo, Laduron (1987) en un trabajo de revisión aparecido recientemente propone la participación del soma y los flujos axónicos en el mecanismo de la memoria a largo plazo. El autor recurre de nueva cuenta a la vieja idea del crecimiento neuronal asociado a la formación de nuevas sinapsis. Para explicar la necesaria incitación de síntesis de proteínas por parte del genoma ubicado en el núcleo neuronal, este autor en base a sus experimentos en el nervio vago de la rata, supone la ingerencia de neuromoduladores (receptores presinápticos junto con sus ligandos) que viajan, a lo largo de días, a través del flujo axónico retrógrado y así hacen las veces de una señal que desencadena el proceso del crecimiento neuronal. La investigación sobre la autonomía de la terminación en estos procesos de tan largo plazo se escapa del propósito de la presente tesis.

El hallazgo de la distorsión del curso temporal de la PPT en las

condiciones de bloqueo parcial nicotínico es consistente con los trabajos de R. Eccles (1952) quien encontró que la d-tubocurarina da lugar a un proceso de PPT mas lento, en comparación con la PPT de los ganglios no curarizados. Tanto el retardo de la cima como el retardo de la pendiente ocurre en los ganglios curarizados. Estos datos constituyen el material de otra parte de nuestra investigación, la cual abordaré en mis tesis doctoral.

CAPITULO 2

Estimulación eléctrica crónica del ganglio autonómico

INTRODUCCION

Se sabe que el sistema nervioso es capaz de desarrollar cambios a largo plazo (días, semanas) en su patrón de respuesta como consecuencia de la estimulación reiterativa aplicada en una escala intermedia (minutos, horas) (Matthies, 1982). Una de las maneras de provocar experimentalmente estos cambios ha sido la estimulación eléctrica repetida de diferentes núcleos cerebrales (Alonso-deFlorida y Delgado, 1958). El fenómeno mejor conocido que se obtiene mediante este método es el efecto kindling (Goddard y col, 1969). Es de esperarse que el ganglio autonómico, al igual que otros nucleos del sistema nervioso pueda desarrollar cambios en su patrón de respuesta como consecuencia de la estimulación eléctrica reiterativa.

La hipótesis de este trabajo es justamente que la estimulación eléctrica periódica en las vías aferentes del ganglio simpático cervical superior (gacs) in situ del gato, puede provocar cambios en su patrón de respuestas posganglionares.

Un punto central de este tipo de trabajos es desarrollar una técnica adecuada para poder estimular eléctricamente y de manera precisa una determinada región o núcleo neuronal. En el caso de los núcleos localizados dentro del neuroeje se ha logrado, mediante la

conocida técnica estereotáxica, implantar y fijar electrodos a permanencia en sitios específicos del sistema nervioso central. (Horsley y Clarke, 1908; Hess, 1932). Cuando se trata de estimular núcleos neuronales periféricos, es decir situados fuera del neuroeje, como es el caso de los ganglios autonómicos, no es viable aplicar esta técnica. Para poder estimular el ganglio autonómico, es necesario implementar una técnica ad hoc.

Un problema inherente a cualquier técnica de implante de electrodos a permanencia es la lesión que se produce, sea por la manipulación durante el implante o por la presencia misma del electrodo. Con la técnica de estereotaxia y fijación de electrodos en el cráneo, la lesión que se produce es mínima y cicatriza en unos cuantos días. En el caso del implante de electrodos en núcleos neuronales o nervios periféricos el problema del daño aumenta, ya que es mas difícil mantener inmovibles los electrodos. Tal es el caso del implante para el ganglio simpático cervical superior del gato. Para estimular este ganglio, los electrodos se pueden implantar en dos sitios: directamente sobre el ganglio, ó bien en sus fibras preganglionares que corren en el tronco simpático cervical. En este trabajo se intento la segunda opción.

A lo largo del desarrollo experimental surgieron diferentes problemas de orden técnico, algunos de los cuales, como mantener intacto y en su sitio al electrodo, pudimos superarlos; mientras que otros, como el daño del nervio preganglionar, no fue posible superarlo. En lo que sigue relataré en detalle la técnica que se empleó en la

elaboración e implante del electrodo. Se logró obtener algunos resultados de tipo preliminar, mismos que también relataré. Al final, en una breve discusión analizaré las posibles implicaciones, así como la relevancia de los resultados que se consiguió obtener.

METODO

Se utilizaron gatos adultos machos con peso de entre 2 y 3 Kg. para todos los experimentos.

Electrodo

El electrodo de implantación crónica para estimulación reiterativa en el tronco simpático cervical se diseñó y manufacturó durante el desarrollo de este trabajo.

Diseño y elaboración

Las dificultades planteadas durante la elaboración del electrodo fueron: i) evitar la lesión, que pudiera llegar a sección completa, del nervio preganglionar producida en el animal despierto y como consecuencia de la fricción del electrodo sobre el nervio debida a los movimientos del cuello y la cabeza; ii) impedir la salida del nervio de su colocación dentro del electrodo; iii) evitar la sección de los cables conductores del electrodo, debido a repetidos dobleces de aquellos.

La lesión o sección del nervio se pudo detectar por el signo clínico de anisocoria con miosis y relajación de la membrana nictitante en el ojo homolateral al implante. La dislocación del nervio o la ruptura de los cables dio lugar a que el estímulo, a la intensidad habitual, no provoque dilatación pupilar, y que al aumentar la intensidad se observen contracciones de los músculos situados

alrededor del sitio del implante.

Los electrodos consistieron de dos partes: Cada una se implantó independientemente con un intervalo de 7 días. Si se implanta todo el electrodo en un solo tiempo, su peso provoca demasiada tracción en el nervio. Con el método de implante en dos tiempos se disminuye la tracción sobre el nervio, ya que la primera parte es lo suficientemente liviana como para no traccionarlo y que, a los 7 días después de la implantación, el tejido conectivo cicatricial es capaz de fijar la primera parte del electrodo antes de implantar la segunda parte.

La primera parte (Fig 2.1) consistió en un alambre de acero inoxidable de 0.15 mm de diámetro, que se insertó a un tubo de tygon (Cole Parmer) de 1 mm de calibre por 6 mm de longitud, de modo que del exterior del tubo el alambre se pasó por un orificio al interior y luego, por otro contiguo situado a 1 mm de distancia, se regresó al exterior. De esta manera la superficie del alambre que quedó en el interior del tubo es de aproximadamente 0.15 mm². Esta área funcionó como superficie de contacto para estimular al nervio. En la pared del tubo se practicó un corte longitudinal enfrente y paralelo a la superficie de contacto del alambre de acero. Los extremos exteriores del alambre se trenzaron entre sí y se soldaron a la punta desnuda de un cable con cubierta de plástico inerte (cable de prótesis para sordera) de 30 mm de largo. Ya soldados los alambres, la cubierta del cable se deslizó hasta topar con el tubo. Después se pegó esta union del cable y el tubo con barniz inerte. En el extremo que queda libre del cable se soldó un miniconector tipo amphenol que posteriormente se

cubrió con acrílico dental. Sobre el cable se amarró una tira de silastic de 30 mm de largo, 4 mm de ancho y 1 mm de grosor la cual se denominó "ancla". La función del ancla fue evitar que el tubo rotara sobre su eje longitudinal o transversal. La ubicación del ancla quedó con su eje mayor paralelo al eje mayor del tubo a una distancia de 10 mm

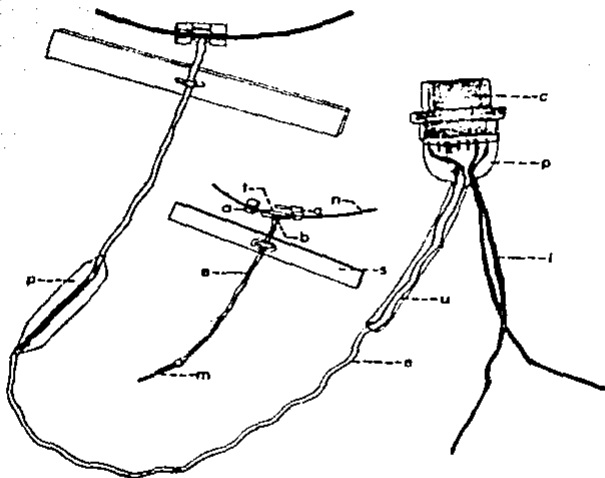


Fig 2.1 Esquema del electrodo para la implantación y estimulación crónica de nervios, particularmente del tronco simpático cervical. Al centro se detalla la porción terminal o primera parte del electrodo en su forma previa al implante. Los símbolos indican: t: tubo de tygon de 1 mm de calibre a través del cual se pasa el nervio preganglionar (n) s: lamina de silastic que funciona como ancla para evitar la rotación del electrodo, c: cable conductor aislado con una cubierta de plástico inerte, m: miniconectores tipo amphenol, a: anillos de acrílico, b: barniz de sujeción, c: conector Canon ITT, i: alambre de acero de 0.5 mm de grosor para amarre, p: recubierta de acrílico para proteger las conexiones, u: tubo de tygon de 1.5 mm de calibre.

entre ambos ejes. Por último se construyeron dos anillos abiertos de acrílico dental. En el momento del implante y, después de colocar al nervio dentro del tubo, se ensartaron los anillos y luego se unieron entre sí a través de un puente también de acrílico para evitar la apertura del tubo y la consiguiente dislocación del nervio.

La segunda parte del electrodo (Fig 2.1) consistió en un cable de 12 cm de largo y del mismo material al utilizado en la primera parte. En uno de sus extremos se soldó un miniconector amphenol que sirvió para hacer la conexión con el miniconector soldado a la primera parte del electrodo. El otro extremo se soldó a la terminal número 1 de un conector tipo telefónico (Canon ITT con 9 terminales). Para proteger al cable en su porción cercana al conector, se introdujo en un tubo de tygon (Cole Parmer) de 35 mm de largo y 1.2 mm de calibre. Se soldó un alambre de acero inoxidable maleable de 0.5 mm de grosor a las terminales 8 y 9 del conector. Este alambre tenía dos funciones, una para la sujeción por medio de un amarre al cráneo del animal y, otra como electrodo indiferente. El cable con su tubo protector, el alambre y la base del conector se cubrieron con una pirámide de acrílico adosada al conector. Finalmente el tubo de tygon se relleno con silastic.

Implante

El electrodo se implantó en dos tiempos quirúrgicos con un intervalo de 7 días:

En el primer tiempo, bajo anestesia con pentobarbital sódico

(anestésico) se practicó una incisión en la línea media de la cara ventral del cuello. Previa disección por planos se localizó el paquete vasculonervioso del cuello, de este paquete se separó la cadena simpática (nervio preganglionar) del nervio vago y de la arteria carótida primitiva. Se disecó una porción del nervio y se introdujo al tubo del electrodo a través de su ranura longitudinal. Se disecó un túnel lateral en el cuello entre la piel y los músculos; por dicho túnel se introdujo el cable con su miniconector amphenol soldado en el extremo opuesto al tubo. El ancla de silastic se colocó entre los músculos del cuello para impedir la rotación del cable del electrodo. Finalmente se ensartaron los anillos de acrílico en los extremos del tubo. Uno de estos anillos llevó un pequeño puente por medio del cual se pegó al otro anillo con un pegamento hecho con acrílico disuelto por cloroformo. Con esto se conseguía evitar que los anillos se deslizaran.

En el segundo tiempo, se anestesió al animal con pentobarbital sódico. Se practicó una incisión en la cara lateral del cuello para localizar el miniconector; se realizó otra incisión en la región occipital; se desinsertaron los músculos dorsales y temporales de la cresta de la nuca; se hicieron cuatro trépanos dos a cada lado de la cresta que sirvieron para hilvanar el alambre a fin de amarrar el conector; se disecó un canal entre la piel y los músculos del cuello hasta alcanzar el miniconector. Por este canal se pasó el cable, y luego se unieron ambos miniconectores y se cubrieron con acrílico. La idea de usar miniconectores es evitar la lesión por calentamiento de

los nervios que pudiera producirse al intentar la unión por soldadura. Al terminar se verificó la funcionalidad del electrodo, por medio del paso de un tren de pulsos eléctricos aplicados a través del electrodo recién implantado al nervio preganglionar. Este estímulo provocaba una clara dilatación pupilar homolateral al sitio implantado.

Técnica de estimulación crónica

Algunos días después del implante se inició la estimulación. Se colocó al animal despierto en una caja de observación donde podía moverse libremente. Se aplicaron trenes de pulsos cuadrados bifásicos supramáximos con duración de 0.2 mseg, generados por un estimulador Grass S4DR. La intensidad supramáxima se obtuvo sumándole un 25 % a la intensidad que provocó la dilatación pupilar máxima. A lo largo de todo el periodo experimental, se probaron diferentes esquemas de estimulación (ver Tabla 2.1).

Detección de posibles cambios plásticos

Durante la estimulación

Las observaciones, realizadas durante el periodo de estimulación se dirigieron a detectar: i) modificaciones en el diámetro de la pupila o en su motilidad como respuesta a la luz; ii) cambios en el tono de la membrana nictitante; iii) modificaciones paulatinas y progresivas en las respuestas pupilares y de la membrana nictitante; y iv) cambios en la secreción salival.

En el registro agudo

Al final de la estimulación crónica, los animales se prepararon para el registro agudo postganglionar in situ, según la técnica descrita en el capítulo anterior. En estas preparaciones se estudió: i) cambios en la magnitud de la descarga como respuesta a los estímulos únicos; ii) cambios en la morfología del potencial de acción compuesto postganglionar; iii) cambios en los efectos de convergencia y suma espacial; iv) aparición de actividad espontánea oscilatoria; v) alteración en los fenómenos de potenciación; y vi) cambios morfológicos.

RESULTADOS

Evaluación de la técnica experimental

En total se implantaron 31 gatos. Se probaron diversas formas de electrodos. En los últimos 15 animales se usaron los electrodos con el diseño descrito en la sección de "Métodos". De estos 15 gatos sólo se alcanzaron a registrar 9, en los otros 6 el daño al nervio impidió el registro.

La lesión del nervio se detectó por los signos clínicos de miosis y relajamiento de la membrana nictitante homolateral al nervio implantado. La lesión presentó diferentes grados, desde miosis mínima con membrana nictitante sin cambios, hasta signos de franca denervación con miosis severa y total relajamiento de la membrana nictitante. También varió el tiempo de aparición de la lesión. En algunas ocasiones apareció la miosis y el relajamiento de la membrana nictitante 12 hrs después del implante. En otros casos el intervalo entre el final del implante y la aparición de signos clínicos de lesión fue de varios días.

Algunos animales con lesión se mantuvieron en observación durante algún tiempo para seguir la evolución de la lesión. En algunos de ellos la relajación de la membrana nictitante, así como la anisocoria involucionó lentamente hasta desaparecer y restablecerse la isocoria con membrana nictitante normal en plazo promedio de 10 días.

Otros gatos con lesión se sacrificaron para detectar el origen del daño. La lesión del nervio fue de compresión o acodamiento, y en

algunos casos sección total. Otras veces la lesión sólo fue detectable mediante estudio histológico.

Efectos de la estimulación

Como ya se mencionó, en el estudio se emplearon 9 gatos (Tabla 2.1), 7 se implantaron y estimularon y dos sólo se implantaron. De los nueve estudiados, 3 resultaron sin signos clínicos de lesión marcados con 0 en la tabla 2.1). Los otros seis presentaron diferentes niveles de lesión. Tres tuvieron lesión mínima (1 y 2 en la tabla 2.1) y tres severa (3 y 4, tabla 2.1), uno de cada grupo se registró cuando aún presentaba signos de lesión, y los otros dos se registraron después de su recuperación total. Los resultados se dividieron en cambios durante el período de estimulación y cambios en el registro agudo efectuado al término de la estimulación. En lo que sigue se relatarán los cambios más notorios que encontramos, en la tabla 2.1 se presentan todos los cambios encontrados.

Cambios durante la estimulación crónica

a) Oscilaciones en el diámetro pupilar. En los periodos interestímulo, en algunos animales, se encontraron oscilaciones unilaterales en el diámetro pupilar que no guardaban relación con el fenómeno de acomodación ni el reflejo fotomotor.

b) Retardo en la recuperación del diámetro pupilar. En condiciones normales al terminar el estímulo, la pupila se demoraba en promedio 4 segundos para retornar a su diámetro previo al estímulo.

Tabla 2.1. Cambios provocados por la estimulación crónica del ganglio simpático cervical superior

SUJETOS	Nivel de lesión	Parámetros de estímulo	Cambios durante la est. crónica			Cambios durante el registro agudo			Peso del ganglio	
			Días entre est. y reg.	Oscilación del diám. pupilar	Tiemp. de roc. mitosis	PPT		Postdescargas al final del tren		
						Cim	Arco			Pendiente
1	0	1 Hz, 60 s; 8 h, 7 d/ 24 Hz, 2 s; 24 h, 7 d	1	+	3 s	1.90	347.85	-0.0100	0	---
2	3	1 Hz, 60 s; 8 h, 7 d/ 24 Hz, 2 s; 24 h, 7 d	2	0	3 s	1.10	306.55	-0.0007	0	---
3	4 Recp. a los 14 d	24 Hz, 5 s; 90 s, 60 m; 12 h, 14 d	1	+	10 s	2.33	410.25	-0.0083	0	---
4	0	1 Hz, 72 s; 8 h, 2 d/ 24 Hz, 2 s; 8 h, 2 d	15	—	—	2.70	376.40	-0.0126	+	---
5	2 Recp. a los 18 d	24 Hz, 4 s; 90 s, 60 m; 12 h, 2 d	1	+	6 s	1.86	315.60	-0.0087	++	c= 44.6 mg c= 33.3 mg
6	0	24 Hz, 4 s; 90 s, 60 m; 12 h, 2 d	7	+	10 s	1.54	348.60	-0.0029	0	---
7	1	—	56 desp. implante	—	—	1.44	313.06	-0.0052	+	---
8	2	24 Hz, 4 s; 80 s, 60 m; 12 h, 2 d Rept. a los 7 d	6	0	4 s	1.30	320.95	-0.0014	0	c= 22.3 mg c= 17.7 mg
9	0 Les. 4 a los 20 d	—	21 desp. implante	—	—	1.33	345.90	-0.0060	0	l= 9.3 mg c= 12.1 mg

Símbolos: s: segundos, m: minutos, h: horas, d: días, Hz: herztz, Recp: recuperación, Les: lesión, Rept: repetición, e: estimulado i: implantado, c: control, j: cada, j: durante, /: cambio de estimulación.

En algunas ocasiones, conforme transcurrían las sesiones de estímulo, este tiempo aumentaba.

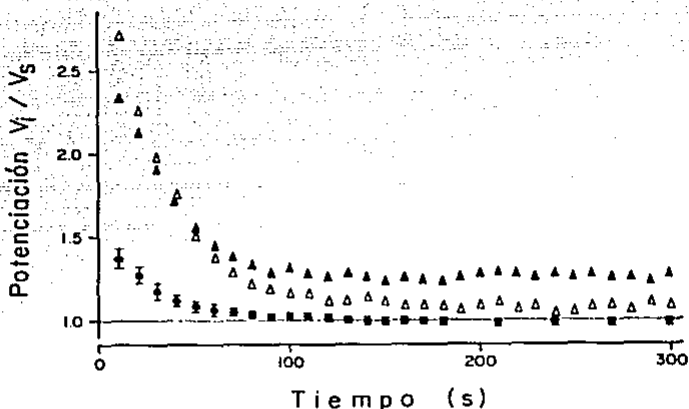


Fig 2.2 Aumento de la PPT en el ganglio simpático como consecuencia de su estimulación eléctrica crónica repetitiva. Se muestra el curso temporal en los 300 s (5 minutos) posteriores al final de la aplicación de un tren tetanizante de 24 Hz durante 30 s. El cero indica el final del tren. La potenciación se midió según la normalización V_1/V_5 , donde V_1 es la amplitud de la onda S_2 en los potenciales posteriores al tren y V_5 es la amplitud de la misma onda en el potencial obtenido justo antes de aplicar el tren. Se graficó la media de la PPT de 5 experimentos control (—●—●—) y la PPT de dos ganglios (—▲—▲—), (—▲—▲—) previamente sometidos a la estimulación eléctrica crónica repetitiva.

Cambios en el registro agudo

a) Cambios en la potenciación postetánica. Como ya vimos en el primer capítulo de esta tesis, un tren de 24 Hz aplicado durante 30 seg provoca, en los ganglios no estimulados crónicamente, un efecto de potenciación postetánica con una cima de 1.37 ± 0.06 (mediana e.e.), y un área bajo la curva de 305 ± 3 . Dos de los ganglios estimulados

presentaron cimas y áreas considerablemente mayores que los valores control antes citados. Las cimas fueron 2.70 y 2.33 y las áreas 410.25 y 376.40 (Fig 2.2).

b) Oscilación al terminar la aplicación de un tren de alta frecuencia. Al terminar de aplicar un tren de alta frecuencia (24 Hz), el registro antes de retornar a su línea basal, normalmente presenta una oscilación amortiguada de las siguientes características: una onda ascendente con duración de 0.2 mseg y con el 80% de la amplitud de los potenciales intratrón, luego una onda descendente de la misma duración

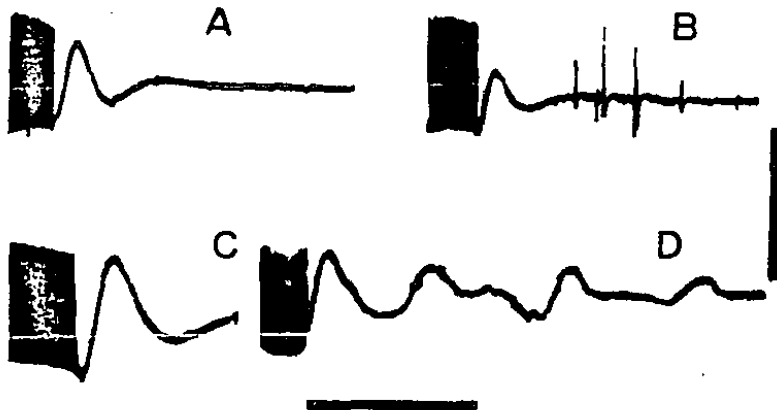


Fig 2.3 Registros de potenciales compuestos postganglionares provocados por la aplicación al nervio preganglionar de trenes de pulsos cuadrados bifásicos de 0.2 mseg. a 24 Hz durante 4 seg. En cada pánel se muestra el final del registro intratrón (los últimos dos segundos), así como la secuencia de recuperación del registro. Cada secuencia se obtuvo de un experimento diferente. A: control sin implante; B, C y D: registros de ganglios a los que previamente se los estimuló crónicamente a través del electrodo implantado en el nervio preganglionar. Calibración: tiempo: 10 seg, amplitud: 1 mv.

y 70% de amplitud, esta secuencia se repite con la misma duración pero con menor amplitud una vez mas antes de retornar al valor basal (Fig 2.3A). En tres ganglios la respuesta se apartó de este patrón: en uno, a los 4 seg de terminada la oscilación apareció una ráfaga de potenciales espontáneos (Fig 2.3B); en otro la amplitud de la oscilación superó la amplitud de los potenciales intratrén (Fig 2.3C); en el tercero las ondas de la oscilación continuaron, sin amortiguación por más de 20 seg para finalmente amortiguarse y retomar los valores basales (Fig 2.4D).



Fig 2.4 Comparación de los dos ganglios simpáticos cervicales superiores de un mismo gato. Se muestra la diferencia entre el ganglio estimulado (arriba) contra el no estimulado (abajo), la escala es en centímetros.

c) Cambios anatómicos. En dos ganglios estimulados así como en el implantado control, se comparó macroscópicamente el volumen del ganglio implantado con el contralateral. En dos de los estimulados, se

encontró una diferencia entre los dos ganglios de cada animal (Fig 2:4). En un experimento el ganglio estimulado peso 44.6 mg y el contralateral 33.3 mg; y en el otro el peso del estimulado fue de 22.3 mg y el del contralateral 17.7 mg. En el tercer experimento, implantado sin estimular, el ganglio implantado peso 9.3 mg y el contralateral 12.2 mg.

DISCUSION

Los resultados aquí presentados, aunque preliminares, muestran que la estimulación eléctrica crónica reiterativa del ganglio simpático cervical superior in situ del gato, puede provocar cambios en su patrón de respuesta normal. Estos cambios se manifestaron de dos maneras diferentes. La primera son modificaciones en las propiedades fisiológicas del ganglio, tales como: i) mayor efecto de potenciación posttetánica; ii) aparición de actividad oscilatoria ya sea en forma de pequeñas espigas o de respuestas lentas de varios segundos de duración. La segunda son cambios morfológicos como aumento en el volumen y peso del ganglio.

Los cambios detectados apuntan hacia modificaciones de la eficacia sináptica de tipo facilitatorio en la escala de largo plazo. Así fue posible constatar un marcado incremento en el efecto de potenciación provocado por un tren tetanizante de 24 Hz aplicado durante 30 seg y la aparición de actividad espontánea en forma de postdescargas lentas oscilatorias de varios segundos. Llama la atención los cambios morfológicos que, aunque no se exploraron en el nivel microscópico, apuntan hacia un crecimiento ganglionar como consecuencia de la estimulación crónica.

Según estas consideraciones, resulta de sumo interés indagar con mayor precisión las alteraciones que desarrolla el ganglio autonómico como consecuencia de la estimulación crónica. Sin embargo como pudo constatarse a lo largo de este trabajo, el implante de

electrodos a permanencia en este ganglio en particular, conlleva un considerable número de problemas de orden técnico, de los cuales no se logro superar totalmente la lesión del nervio, lo que nos impidio obtener el número necesario de experimentos para tener suficiente precisión en los hallazgos. Una posibilidad para salvar los problemas técnicos, es estimular otro ganglio autonómico, cuya disposición anatómica permita, con menor dificultad, el implante y la estimulación crónica. El ganglio ciliar por ejemplo resulta adecuado, ya que se estimularía a través de electrodos implantados estereotáxicamente en su nervio preganglionar (nervio motor ocular común).

CONCLUSIONES

1. La terminación presináptica ganglionar que se sabe es el asiento de la potenciación postetélica, es autónoma al integrar este proceso facilitatorio. El cuerpo celular no participa de una manera inmediata, pues la descentralización no modifica el proceso de potenciación.

2. El ganglio simpático es, al parecer, capaz de desarrollar cambios plásticos después de la estimulación iterativa crónica. Sin embargo, esta conclusión deberá ser sujeta a experimentación ulterior con una técnica más depurada.

REFERENCIAS

- 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. and Delgado, J.M.R. (1958): Lasting behavioral and EEG changes induced by prolonged stimulation of amygdala. Am. J. Physiol. 193: 223-229.
- Bach y Rita, P., Collins, C.C., Saunders, F., White, B. and Scadden, L. (1969): Vision substitution by tactile image projection. Nature, 221: 963-964.
- Birks, R.L. (1977): A long-lasting potentiation of transmitter release related to an increase in transmitter stores in a sympathetic ganglion. J. Physiol., 271: 847-862.
- Bishop, G.H. and Heinbecker, P. (1932): A functional analysis of the cervical sympathetic nerve supply to the eye. Amer. J. Physiol., 100: 519-532.
- Bliss, T.V.P. and Lomo, T. (1973): Long-lasting potentiation of synaptic transmission in the dentate area of the anaesthetized rabbits following stimulation of the perforant path. J. Physiol. 232: 331-356.
- Briggs, C.A., Brown, T.H. and McAfee, D.A. (1985): Neurophysiology and pharmacology of long-term potentiation in the rat sympathetic ganglion. J. Physiol. 359: 503-521.
- Bronk, D. W.(1939): Synaptic mechanisms in sympathetic ganglia. J. Neurophysiol. 2: 380-401.
- 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.
- 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.
- Cotman, C.W. and Nieto-Sampedro, M. (1982): Brain function, synapse renewal and plasticity. Ann. Rev. Psychol. 33: 371-401.
- Cragg, B. G. (1970): What is the signal for chromatolysis? Brain Res. 23: 1-21

- Eccles, J.C. (1935): The action potential of the superior cervical ganglion. J. Physiol. 85: 179-206.
- Eccles, R. M. (1952): Action potentials of isolated mammalian sympathetic ganglia. J. Physiol. 117: 181-195.
- Erulkar, S.D. (1983): The modulation of neurotransmitter release at synaptic junctions. Rev. Physiol. Bioch. Pharmacol., 98: 63-175.
- Forbes, A. (1922): The interpretation of spinal reflexes in terms of present knowledge of nerve conduction. Physiol. Rev. 2: 361-414.
- Geffen, L.B. and Livet, B. G. (1977): Synaptic vesicles in sympathetic neurons. Physiol. Rev. 51: 98-157.
- Goddard, G.V., McIntyre, D.C. and Leech C.K. (1969): A permanent change in brain function resulting from daily electrical stimulation. Exp. Neurol. 25: 295-330.
- Grafstein, B. and Murray, M. (1969): Transport of protein in goldfish optic nerve during regeneration. Exp. Neurol. 25: 494-508.
- Guzman-Flores, C., Pacheco, P., Salas, M. and Alcaraz, M. (1963): Some data for neurophysiological model of learning. Bol. Inst. Est. Med. Biol. 21: 247-257.
- Hebb, D.O. (1949): The organization of behavior John Wiley & Sons. New York.
- Hess, W.R. (1932): Beitrage zur Physiologie des Hirnstammes. I Die Methodik der lokalisierten Reizung und Ausschaltung subkortikaler Hirnabschnitte. Leipzig: Thieme.
- Horsley, V. and Clarke, R.H. (1908): The structure and functions of the cerebellum examined by a new method. Brain 31: 44-124.
- Hughes, J. R. (1958): Post-tetanic potentiation. Physiol. Rev. 38: 91-113.
- Kandel, E. R. (1977): Neuronal plasticity and the modification of behavior. In: Handbook of Physiology Eds. Brookhart, J. M. and Mountcastle, V. B. American Physiological Society. Bethesda Maryland. pp 1137-1181.
- Kornorsky, J. (1948): Conditioned reflexes and neuron organization. Cambridge. Univ. Press. London and New York.
- Kozak, W. and Westerman, R.A. (1961): Plastic changes of spinal monosynaptic response from tenotomized muscle in cats. Nature 193: 171-173.

- Laduron, P. M. (1987): Axonal transport of neuroreceptors: possible involvement in long-term memory. Neuroscience 22: 767-779.
- Langmeier, M. and Mares, J. (1984): Changes in some ultrastructural parameters of central synapses in the initial phases of kindling. Physiol Bohemoslov. 33: 367-375.
- Larrabee, M. G. and Bronk, D. W. (1938): Long-lasting effects of activity on ganglionic transmission. Am. J. Physiol. 123: 126.
- Larrabee, M. G. and Bronk, D. W. (1947): Prolonged facilitation on synaptic excitation in sympathetic ganglia. J. Neurophysiol. 10: 139-154.
- Lorente de Nó, R. (1938): Analysis of the activity of the chains of internuncial neurons. J. Neurophysiol. 1: 207-244.
- Louis, E.D., Williamson, P.D. and Darcey, T.M. (1987): Experimental models of chronic focal epilepsy: A critical review of four models. Yale J. Biol. Med. 60: 255-272.
- Maru, E., Tatsuno, J., Okamoto, J. and Ashida, H. (1982): Development and reduction of synaptic potentiation induced by perforant path kindling. Exp. Neurol. 78: 409-424.
- Matthies, H. (1982): Plasticity in the nervous system- An approach to memory research. In: Ajmone-Marsan, G. and Matthies, H (Eds.) Neural plasticity and memory formation Raven Press, pp 1-16 New York.
- McIntyre, D. C. and Wong, R. K. S. (1985): Modification of local neuronal interactions by amigdala kindling examined in vitro. Exp. Neurol. 88: 529-537.
- Miledi, R. and Slater, C. R. (1970): On the degeneration of rat neuromuscular junctions after nerve section. J. Physiol. 207: 507-528.
- Morales, M.A. (1982): Aprendizaje y memoria. Sus mecanismos neurofisiológicos. Naturaleza 13: 275-280.
- Morales, M.A. and Alonso-deFlorida, F. (1988): Modulated delayed potentiation in the cat superior cervical ganglion in vivo. Physiologist. 31: A113.
- Nittono, K. (1923): On bilateral effects from the unilateral section of branches of the nerves trigeminus in the albino rat. J. Comp. Neurol. 35: 133-161.
- O'Brien, R. D. A. (1978): Axonal transport of acetylcholine, choline acetyltransferase and cholinesterase in regenerating peripheral nerve. J. Physiol. 282: 91-103.

- Ochs, S. (1982): Axoplasmic transport and its relation to other nerve functions. John Wiley & Sons, New York.
- Ochs, S. and Ranish W. (1969): Characteristic of the fast transport system in mammalian nerve fibers. J. Neurobiol. 1: 247-261.
- 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.
- Racine, R. and Zide, J. (1978): A further investigation into the mechanisms underlying the kindling phenomenon. In: Livingston, K. E. and Hornykiewicz, O. (eds) Limbic Mechanisms . pp. 457-493.
- Ramón y Cajal, S. (1894): La fine structure des centres nerveux. Pro. Roy. Soc. 55: 444-468.
- 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.
- Snedecor, G.W. (1934): Calculation and interpretation of analysis of variance and covariance. Collegiate Press, Ames, Iowa. 96 pp.
- Soza-Bulnes, S., Morales, M.A. and Alonso-deFlorida, F. (1985): Independence of ganglionic posttetanic potentiation development from central neurons influence. Physiologist 28: 328.
- Zar, J.H. (1984): Biostatistical analysis. Prentice Hall, Englewood Cliffs, 718 pp.