



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO**

FACULTAD DE CIENCIAS

**PATRON MORFOLOGICO DE LA CO-TRANSMISION
SINAPTICA EN GANGLIOS SIMPATICOS**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE
B I O L O G A
P R E S E N T A :
CYNTHIA GABRIELA SAMANO SALAZAR



FACULTAD DE CIENCIAS
UNAM

DIRECTOR DE TESIS:
DR. MIGUEL ANGEL MORALES MENDOZA



FACULTAD DE CIENCIAS
SECCION ESCOLAR



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

ESTA TESIS NO SALE
DE LA BIBLIOTECA





UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

Autorizo a la Dirección General de Bibliotecas de la UNAM a difundir en formato electrónico e impreso el contenido de mi trabajo recepcional.

NOMBRE: Cynthia Gabriela
Samano Salazar
FECHA: 11 mayo 2004
FIRMA: [Signature]

ACT. MAURICIO AGUILAR GONZÁLEZ
Jefe de la División de Estudios Profesionales de la
Facultad de Ciencias
Presente

Comunicamos a usted que hemos revisado el trabajo escrito:

"PATRON MORFOLOGICO DE LA CO-TRANSMISION SINAPTICA EN GANGLIOS SIMPATICOS"

realizado por CYNTHIA GABRIELA SAMANO SALAZAR

con número de cuenta 9512215-3 , quien cubrió los créditos de la carrera de: BIOLOGIA

Dicho trabajo cuenta con nuestro voto aprobatorio.

Atentamente

Director de Tesis
Propietario

DR. MIGUEL ANGEL MORALES MENDOZA

Propietario

DRA. ANA BRIGIDA CLORINDA ARIAS ALVAREZ

Propietario

DR. JULIO MORAN ANDRADE

Suplente

DR. FREDY ROBERTO CIFUENTES NAVARRO

Suplente

DRA. MARIA EUGENIA GONSEBATT BONAPARTE

[Handwritten signatures of the five members of the Departmental Council]

FACULTAD DE CIENCIAS

Consejo Departamental de Biología

[Signature of Juan Manuel Rodríguez Chávez]
M. EN C. JUAN MANUEL RODRIGUEZ CHAVEZ



El presente trabajo se realizó en el Departamento de Biología celular y Fisiología del Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM; bajo la dirección del Dr. Miguel Angel Morales Mendoza.

Esta tesis fue apoyada por el Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIT) a través del proyecto No. IN217702-3

AGRADECIMIENTOS

Agradezco al Dr. Miguel Morales por la excelente asesoría, apoyo y confianza que me brindó para realizar esta tesis.

Al Investigador asociado, Dr. Fredy Cifuentes por su asesoría y consejos.

A la técnica del laboratorio, Ma. Elena Zetina por el valioso soporte técnico y consejos para realizar este trabajo.

Al Sr. Pedro Medina por toda su ayuda y apoyo en el manejo de animales de experimentación.

A mis compañeros del laboratorio quienes me brindaron siempre su ayuda: Hugo y Jazmín.

DEDICATORIAS

A mis abuelitos (Luz Ma. y Abraham), por haberme dado siempre lo mejor y quienes simplemente se me adelantaron en el camino.

A mis padres y tía "Chabela" por todo el apoyo, ayuda, cariño, comprensión y enseñanza que me han dado, gracias.

A mis hermanos Victorín y Dieguito por alegrar tanto mi vida.

Al amor de mi vida por toda su ayuda, alegría, amor y comprensión: Alfonso

A todos mis tíos, primos y a mi abuelito Beto.

A mis grandes amigos: Juanita, Lupita, Paty, Sandy, Nere, Sebe, Rosa María, Othón, Alfred, Mario, Gabriela, Daniel, Edgar, Mainor, Lucio, Eli, David, Francisco; y a todos aquellos "Guerreros" con quienes pasé momentos tan agradables en la carrera.

CONTENIDO

RESUMEN	1
INTRODUCCION	2
- Transmisión y co-transmisión sináptica.....	4
- Transporte axónico.....	5
- Generalidades del Sistema Nervioso Autónomo (SNA)	6
- Sinapsis ganglionar autonómica	9
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	11
HIPOTESIS	13
OBJETIVO	14
MATERIAL Y METODOS	15
- Procedimiento quirúrgico	15
- Inmunofluorescencia	16
- Análisis confocal	17
RESULTADOS	18
1.- Presencia de inmunorreactividad (IR) a ChAT en neuronas del asta intermediolateral de la médula espinal	18
2.- IR a ChAT y a los neuropéptidos NT, m-Enk, CGRP, SS y VIP en los cuerpos celulares de las NPS	20
3.- Localización independiente de IR a ChAT y a los neuropéptidos NT, m-Enk, CGRP y VIP en terminales axónicas preganglionares del GE del gato	21
4.- Presencia de IR a ChAT y a los neuropéptidos NT, m-Enk, CGRP y VIP en los axones preganglionares del Tronco Torácico Simpático (TTS)	23
DISCUSION	28
CONCLUSIONES	32
BIBLIOGRAFIA	33

ABREVIATURAS

Ach- acetilcolina
AV- avidina
CA- área central autonómica
cc- canal central
ChAT- colina acetil transferasa
CRGP- péptido relacionado con el gen de calcitonina
CRF- factor liberador de la corticotropina
Cy5- indodicarbocyanina
DH- asta posterior, dorsal (sensorial)
FITC- isothiocianato de fluoresceína
GABA- ácido-g aminobutírico
GE- ganglio estelar
IC- núcleo intercalado
IML- asta intermediolateral
IMLf- asta intermediolateral pars funicularis
IMLp- asta intermediolateral pars principalis
IR- inmunorreactividad
LDCV- vesículas grandes de núcleo denso
leu-Enk- leucina encefalina
LF- funículo lateral
met-Enk- metionina encefalina
NPS- neuronas preganglionares simpáticas
NT- neurotensina
PBS- solución de buffer de fosfatos salina
scv- vesículas pequeñas claras
SN- sistema nervioso
SNA- sistema nervioso autónomo
SNC- sistema nervioso central
SP- sustancia P
SS- somatostatina
TxR- rojo texas (texas red)
TX- tritón X-100
TTS- tronco torácico simpático
VIP- péptido vasoactivo intestinal
VH- asta anterior, ventral (motora)

RESUMEN

Las neuronas preganglionares simpáticas (NPS), que forman parte de la vía eferente motora autonómica o visceral, co-expresan en sus cuerpos celulares su transmisor clásico la acetilcolina (ACh) y diferentes péptidos co-transmisores (Kondo et al, 1985), sin embargo, al nivel de las terminales axónicas (en el ganglio estelar (GE) del gato), muestran escasa co-existencia de estos transmisores dando lugar a la presencia de terminales preganglionares no colinérgicas que expresan péptidos (Jiménez et al, 2002). Esta discrepancia en la co-existencia de transmisores en los cuerpos celulares y las terminaciones axónicas, puede indicar que existan subpoblaciones de neuronas ya sea tanto colinérgicas como no colinérgicas en las NPS; o bien que todas sean pluripotenciales y sintetizen tanto ACh como diferentes péptidos y que una vez sintetizados se segreguen a diferentes procesos axonales. Con el propósito de distinguir entre estas dos posibilidades, en este trabajo investigamos la presencia y posible co-existencia de ACh con los péptidos neurotensina (NT), met-enkefalina (m-Enk), péptido relacionado con el gen de calcitonina (CGRP), somatostatina (SS) y péptido vasoactivo intestinal (VIP), en los somas, axones y terminales axónicas de las NPS del gato. Para ello se utilizó marcaje retrógrado, inmunofluorescencia múltiple y análisis de microscopía confocal. Los resultados obtenidos muestran que en los cuerpos celulares de las NPS situados en las astas intermediolaterales de la médula espinal, co-localiza ChAT (enzima que participa en la síntesis de ACh y que se usa como su marcador) con los péptidos NT, m-Enk, CGRP, SS y VIP, mientras que en sus terminales axónicas, a excepción de ChAT y SS, estos transmisores muestran escasa co-existencia. En los axones que corren a lo largo del tronco torácico simpático, sólo encontramos co-localización al interrumpir el transporte axónico, lo que sugiere que los transmisores se transportan de manera secuencial en los axones. Estos datos sugieren que la co-transmisión sináptica de los ganglios autonómicos se establece, contrario a lo hasta ahora establecido, por la concurrencia de terminales presinápticas que independientemente almacenan al transmisor o a los co-transmisores, en vez de la presencia de terminales donde co-existen y se co-liberan transmisores y co-transmisores; así el efecto modulador se ejercería por convergencia a nivel de las neuronas postsinápticas. Los datos también apuntan a que las NPS sintetizan tanto ACh como diversos péptidos, los cuales son transportados independientemente y segregados hacia diferentes botones y terminales axónicas. Por lo tanto, esta segregación se contrapone al principio de Dale (1935), que sostiene que las neuronas presentan la misma combinación de transmisores y co-transmisores en todos sus procesos celulares, y pudiera ser transitoria y obedecer a requerimientos y señales emanadas de las neuronas blanco.

INTRODUCCION

Entre las propiedades distintivas que presentan las neuronas, destacan la excitabilidad y conductibilidad, es decir la capacidad de autogenerar impulsos nerviosos y conducirlos (Guyton et al, 1998; Nicholls et al, 2001).

Las neuronas son las encargadas de transmitir las señales nerviosas que se generan en la periferia hacia el cerebro y de este a los órganos periféricos. Esto lo realizan mediante **potenciales de acción**, que son cambios rápidos y reversibles en el potencial de membrana. Las neuronas tienen una polaridad más negativa con respecto al exterior, lo que se conoce como *potencial de reposo de la membrana*; sin embargo, cuando una neurona se excita permite el paso de iones positivos a su interior lo que produce un cambio en su polaridad que puede alcanzar valores positivos, fenómeno conocido como *depolarización* que da lugar a un potencial de acción, el cual después de unos cuantos milisegundos regresa, a través de una *repolarización*, a los valores del potencial de reposo (para revisión ver: Wilson et al, 1997; Guyton et al, 1998).

La transmisión de señales se da a lo largo de las neuronas, por lo general de las dendritas y somas a los axones y de ahí a sus botones terminales; así como entre las neuronas en las zonas de aproximación conocidas como **sinapsis**. Las sinapsis, pueden ser eléctricas o químicas de acuerdo a la forma en como se transmite la señal (Bear et al, 1996; Wilson et al, 1997; Guyton et al, 1998).

En las **sinapsis eléctricas** los impulsos eléctricos pasan directamente de una célula a otra, sin necesidad de que exista algún mediador químico; esto es a través de estructuras llamadas "gap junction" las cuales están formadas por 2 proteínas de membrana, cada una de las cuales forma un *hemicanal* con 6 subunidades

denominadas *conexinas* y éstas a su vez conforman un *conexón*. Esta sinapsis se caracteriza porque no presenta retardo sináptico, la conducción es rápida y puede ser ó no bidireccional (para revisión ver: Bear et al, 1996; Wilson et al, 1997).

En las **sinapsis químicas**, a diferencia de las sinapsis eléctricas, interviene un mediador químico que transmite las señales nerviosas de una célula, a la que se le llama *presináptica*, a otra célula conocida como *postsináptica*; se caracteriza porque existe un retardo sináptico y es unidireccional (para revisión ver: Bear et al, 1996; Wilson et al, 1997; Guyton et al, 1998).

Los mediadores químicos liberados por las células presinápticas son los responsables de la transmisión de la información nerviosa, de ahí su nombre de **neurotransmisores**. Desde los estudios realizados por Dale en los años 30 (Dale, 1935) se conocen varias moléculas que actúan en el sistema nervioso como neurotransmisores, entre los cuales se encuentran sustancias de bajo peso molecular como la acetilcolina (Ach), catecolaminas (aminas biogénicas), aminoácidos, etc. Cuando un potencial de acción es propagado a la terminal presináptica, la depolarización de la membrana provoca que las vesículas sinápticas, donde se encuentran los neurotransmisores, se fusionen con la membrana presináptica y liberen el neurotransmisor hacia el espacio sináptico por un proceso denominado *exocitosis*. Una vez liberado, el transmisor se une a receptores específicos que se encuentran en la célula postsináptica, generando un cambio en la permeabilidad de la membrana dando lugar a la excitación o inhibición de la neurona (para revisión ver: Guyton et al, 1998; Nicholls et al, 2001).

Transmisión y co-transmisión sináptica

Durante varias décadas se consideraba que cada sinapsis utilizaba un sólo mediador para transmitir los impulsos nerviosos. Sin embargo, en los años 60 se describió que además de los transmisores principales también conocidos como clásicos, las sinapsis podían presentar una gran variedad de sustancias químicas (monoaminas, gases, purinas y péptidos) lo que dió lugar a los conceptos de *co-transmisión* y *códigos químicos de la neurotransmisión* (Burnstock, 1976; Hökfelt, 1986); a estos nuevos mediadores se les llamó **co-transmisores** o **neuromoduladores**. Dichos hallazgos de co-almacenamiento planteaban la posibilidad de que los co-transmisores también participaban en la transmisión sináptica, ya sea como neurotransmisores o como moduladores.

El mecanismo de síntesis de los neurotransmisores y co-transmisores es diferente, ya que los neurotransmisores se pueden sintetizar dentro de la terminal del axón de la neurona, mientras que algunos co-transmisores, como los péptidos, se producen sólo en el cuerpo neuronal desde donde alcanzan las terminales a través del transporte axónico. Estudios realizados con microscopía electrónica mostraron diferentes tipos de vesículas en las terminales sinápticas, unas electrolúcidas conocidas como pequeñas y claras (**small clear vesicles, scv**) y otras de mayor tamaño con núcleo electrodense, conocidas como grandes de núcleo denso (**large dense core vesicles, LDCV**), (Hökfelt, 1991; Bear et al, 1997; para revisión ver: Jiménez et al, 2001). Se ha visto que las scv contienen exclusivamente a los neurotransmisores clásicos, mientras que las LDCV pueden contener tanto a co-transmisores como transmisores clásicos (Bean et al, 1994; Landry et al, 2003).

Por otro lado, se ha propuesto que el mecanismo de liberación es diferente para los transmisores clásicos y los co-transmisores; así los primeros se liberan con todo tipo de estimulación, mientras que los co-transmisores requieren de frecuencias altas (Hökfelt, 1991). Además de que sus procesos de exocitosis difieren en la dependencia de Ca^{++} como en las proteínas y vesículas membranales involucradas (Bean et al; 1994). Se acepta en general que la transmisión y co-transmisión se llevan a cabo por la presencia de botones y terminales presinápticas que co-almacenan y co-liberan dependiendo de la frecuencia de estimulación al transmisor principal junto con uno o más co-transmisores (Burnstock, 2004).

Transporte axónico

El transporte axónico fue descubierto en los años 40 por Weiss y colaboradores, quienes observaron que la ligadura de los nervios periféricos, daba lugar a una acumulación de material en el sitio de constricción entre el cuerpo celular y la ligadura. Existen dos tipos de transporte axónico el *anterógrado*, del soma a la terminal axónica y el *retógrado* en dirección opuesta. El transporte axónico anterógrado dependiendo de su velocidad se divide en lento y rápido. Las enzimas necesarias para la síntesis de los transmisores clásicos y proteínas estructurales, tales como tubulina y neurofilamentos son transportadas por el *transporte axonal lento* (0.5-5 mm/día), mientras que los organelos membranosos como mitocondrias y vesículas se mueven por el *transporte axonal rápido* (hasta 400 mm/día) (para revisión ver: Purves et al, 2001; Nicholls et al, 2001).

El transporte axonal se lleva a cabo a través de los microtúbulos, los cuales tienen una polaridad inherente llamada "*plus end*" y "*minus end*". En el transporte anterógrado los organelos se unen a los microtúbulos y mediante la *kinesina* se mueven hacia el *plus end*; mientras que en el transporte retrógrado los organelos se

unen y son llevados por la *dineína* hacia el *minus end* (para revisión ver: Nicholls et al, 2001).

Generalidades del Sistema Nervioso Autónomo (SNA)

El SNA es la parte del sistema nervioso (SN) que controla las funciones llamadas autonómicas o vegetativas. El SNA controla esencialmente las funciones viscerales del cuerpo, como la presión arterial, la motilidad y secreción gastrointestinal, y la sudoración entre otras. Esta parte del SN está controlada por centros que se localizan en el tallo cerebral e hipotálamo, así como en zonas de la corteza cerebral específicamente de la corteza límbica. El SNA está formado por tres divisiones: simpática, parasimpática y entérica (para revisión ver: Wilson et al, 1997).

Las señales nerviosas autónomas pueden ser **sensoriales o aferentes y motoras o eferentes**. Las señales nerviosas sensoriales o aferentes se transmiten por estímulos producidos en el medio externo, como en la superficie del cuerpo y señales viscerales; estas señales son transmitidas por dos tipos de fibras: *fibras aferentes primarias* y *fibras aferentes entéricas*; los cuerpos celulares de las primeras se encuentran tanto en el ganglio de la raíz dorsal de la médula espinal como en los ganglios sensoriales de los nervios craneales, donde los axones llevan la información sensorial al sistema nervioso central (SNC). En el segundo tipo de fibras, los cuerpos celulares están en la división entérica y sus axones llevan la información a los ganglios simpáticos prevertebrales con el fin de controlar estos reflejos viscerales (para revisión ver: Wilson et al, 1997; Guyton et al, 1998).

La información motora o eferente autonómica es transmitida a través de las *vías eferentes motoras*, formadas por neuronas preganglionares y postganglionares. En la división simpática las neuronas preganglionares se localizan en el asta intermediolateral (IML) de la médula espinal de T1 a L2 (**Figura 1**), particularmente en

el núcleo *intermediolateral pars principalis* (IMLp) (Dembowsky et al, 1985; para revisión ver: Wilson et al, 1997; Guyton et al, 1998) y *pars funicularis* (IMLf), de igual forma en el *núcleo intercalado* (IC) y en el *área central autonómica* (CA) (Krukoff et al, 1985; Krukoff, 1987). De ahí envían sus axones por los ramos comunicantes blanco y gris a uno de los ganglios de la cadena paravertebral donde hacen sinapsis con células ganglionares (**Figura 2**) (para revisión ver: Wilson et al, 1997).

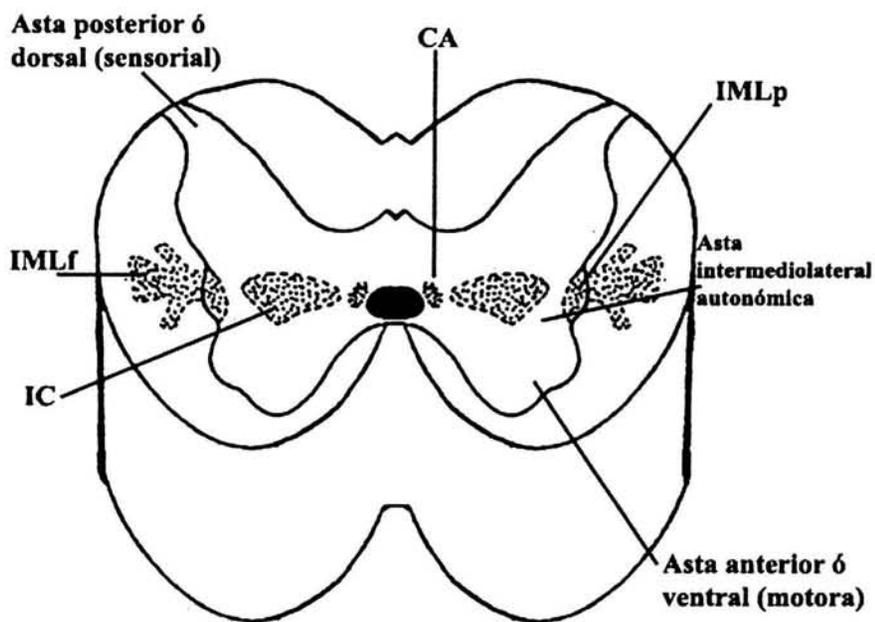


Figura 1. Esquema de un segmento de médula espinal donde se muestra la localización de los diferentes núcleos que albergan a las neuronas preganglionares simpáticas (NPS). Las NPS se encuentran en la sustancia gris del asta intermediolateral de la médula espinal, particularmente en el núcleo intermediolateral pars principalis (IMLp), pero también en pars funicularis (IMLf), núcleo intercalado (IC) y área central autonómica (CA).

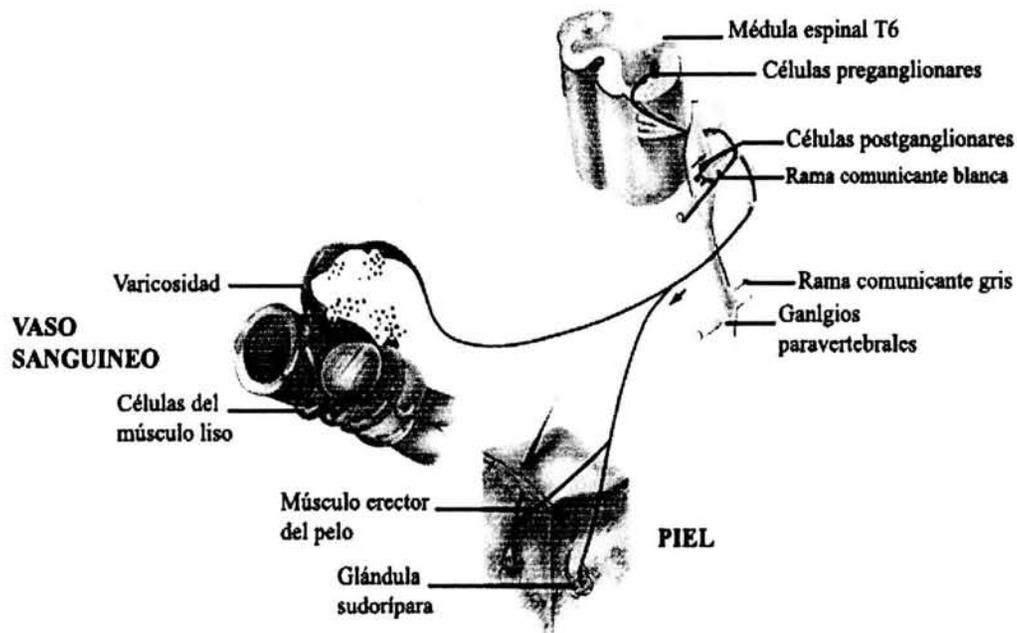


Figura 2. Esquema que muestra la vía motora autonómica. Se muestra la localización de las neuronas preganglionares en la médula espinal, sus axones salen por la raíz ventral o motora para dirigirse a través de la rama comunicante blanca a uno de los ganglios de la cadena paravertebral simpática, y hacer sinapsis con las células ganglionares, los axones de estas últimas neuronas salen a su vez por la rama comunicante gris hacia los órganos blanco.

En la división parasimpática las neuronas preganglionares, se encuentran en el tallo cerebral y en el asta IML de S2 a S4; sus axones salen de la raíz ventral de la médula espinal y se dirigen a uno de los ganglios parasimpáticos, donde hacen sinapsis con las neuronas ganglionares, también conocidas como postganglionares, las cuales a su vez envían sus axones a los órganos blanco. Todos los órganos viscerales son inervados por ambas divisiones, pero sus efectos en algunas ocasiones son antagónicos ya sea estimulando o inhibiendo (para revisión ver: Wilson et al, 1997).

La división entérica consiste de células nerviosas localizadas en la pared intestinal, que funcionan en ausencia de la división simpática y parasimpática. Esta división controla principalmente la motilidad, secreción y absorción intestinal por medio de motoneuronas, neuronas sensoriales e interneuronas que reciben señales de los

nervios simpáticos y parasimpáticos para producir una respuesta (para revisión ver: Wilson et al, 1997; Guyton et al, 1998).

Sinapsis Ganglionar Autonómica

La sinapsis ganglionar autonómica (formada por las neuronas preganglionares y postganglionares) se encarga de relevar la información eferente motora y regular las funciones del músculo liso visceral; y usa como transmisor principal a la Ach (para revisión ver: Wilson et al, 1997; Guyton et al, 1998; Jiménez et al, 2001). En esta sinapsis, se ha detectado por inmunohistoquímica la presencia de **Ach**, (a través de la ChAT, transferasa de acetato y colina; enzima que participa en la síntesis de la Ach y que se usa como su marcador) en los procesos axonales de las neuronas preganglionares, dentro del ganglio simpático (Bachoo et al, 1987; Shafton et al, 1992; Morales et al, 1995); así como varios péptidos co-transmisores, como **VIP** (péptido intestinal vasoactivo) (Johansson et al, 1981; Lamotte et al, 1985; Kummer et al, 1988), **CGRP** (péptido del gen relacionado con la calcitonina) (Lee et al, 1987; Senba et al, 1988; Kummer et al, 1988, 1991; Chiba, 1989; Heym et al, 1993; Morales et al, 1995), **m-Enk** (metionina encefalina) (Lindh et al, 1986; Bachoo et al, 1987; Morales et al, 1995), **leu-EnK** (leucina encefalina), **NT** (neurotensina), **SS** (somatostatina), **CRF** (factor de liberación de la corticotropina) y **SP** (sustancia P) (Bachoo et al, 1987; Wanaka et al, 1987; Shafton et al, 1992; Colombo et al, 1995; Morales et al, 1995), los cuales se han propuesto como moduladores de la transmisión sináptica ganglionar.

También se ha demostrado por doble inmunomarcaje, la co-existencia de ChAT, leu-Enk y m-Enk en botones y terminales axónicas del ganglio simpático y médula adrenal (Lindh et al, 1986; Colombo-Benkman et al, 1995; Morales et al, 1995). De acuerdo con lo anterior, se acepta que las neuronas preganglionares

pueden sintetizar, almacenar y liberar Ach y varios péptidos en sus botones y terminales sinápticas (Benarroch et al, 1994), sin embargo, se ha visto que la coexistencia de Ach y la Enk es más bien un evento raro, debido a que varios botones y terminales preganglionares axónicas pueden ser IR a m-Enk pero no a ChAT; lo cual sugiere la existencia de una población de fibras preganglionares encefalinérgicas negativas a ChAT (Elfvín et al, 1993, Morales et al, 1995). En la misma línea, estudios realizados en nuestro laboratorio demuestran la existencia de un grupo de fibras IR a NT pero no a ChAT en el ganglio estelar del gato (GE) (Jiménez et al, 2002). Además, en estudios preliminares con inmunomarcaje simultáneo hemos mostrado la coexistencia de ChAT con los péptidos NT y m-Enk en los cuerpos celulares de las NPS, pero no en los botones y terminales axónicas del GE del gato (Sámano et al, 2002; Morales et al, 2003, sin publicar).

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Según el concepto de co-transmisión aceptado actualmente, las terminales axónicas de las neuronas preganglionares simpáticas (NPS) co-almacenan y co-liberan a la Ach junto con uno o más péptidos. Sin embargo, estudios realizados en nuestro laboratorio, han mostrado una localización independiente de Ach con los péptidos NT y m-Enk en fibras y terminales axónicas preganglionares del ganglio estelar del gato (GE) (Jiménez et al, 2002), con presencia evidente de terminales que contienen a uno de los péptidos y no a la Ach. Por el contrario de estos hallazgos, en los cuerpos celulares de estas neuronas se ha encontrado co-existencia de Ach con el péptido m-Enk (Kondo et al, 1985). De acuerdo a estos datos, resulta necesario re-evaluar el patrón morfológico de la co-transmisión sináptica ganglionar, ya que no obstante que existe co-localización de transmisores y co-transmisores en los cuerpos celulares de las NPS, la co-localización de estos transmisores en las terminales presinápticas de estas neuronas es más bien un evento raro.

El hallazgo de discrepante en la co-localización de transmisores en los cuerpos celulares y la localización independiente en las terminales axónicas, sugiere: i) que existan dos poblaciones de NPS, colinérgicas y no-colinérgicas, y que ambas co-expresen péptidos; o bien, ii) que el soma de una neurona sintetice tanto Ach como péptidos, pero que los segregue hacia distintos botones y terminales axónicas.

La primera posibilidad implicaría la existencia de subpoblaciones de NPS no-colinérgicas que podrían sintetizar, almacenar y liberar en sus terminales presinápticas solamente péptidos, ó estos con otro transmisor clásico diferente a la Ach (catecolaminas, GABA, etc.); en el primer caso las neuronas podrían utilizar a dichos péptidos indistintamente, ya sea como transmisores clásicos o co-

transmisores, sin embargo, esta posibilidad aún no ha sido demostrada en las sinapsis ganglionares.

La segunda posibilidad implicaría que las NPS sintetizen tanto a la Ach como a un co-transmisor y después segregarlos a distintas terminales sinápticas, lo que pudiera contradecir el principio clásico de Dale, enunciado por Eccles (Dale, 1935) el cual sostiene que *“cualquier clase de célula nerviosa opera con la misma combinación de transmisores en todas sus sinapsis”*.

Finalmente, la co-transmisión se pudiera establecer por la liberación conjunta de los distintos mediadores (transmisor principal y co-transmisores) provenientes de diferentes terminales presinápticas y no por la liberación conjunta de mediadores almacenados en los mismos botones presinápticos. Dentro de este esquema, la neuromodulación se explicaría por una acción convergente de los mediadores tanto a nivel presináptico como postsináptico.

HIPOTESIS

- I. Las neuronas preganglionares tienen la capacidad de sintetizar y almacenar en sus cuerpos celulares a la enzima de procesamiento de Ach, la ChAT; así como a varios péptidos y tienen además la potencialidad de segregar estos compuestos a diferentes procesos axonales.

- II. La co-transmisión ganglionar se ejerce pre o post-sinápticamente por la liberación conjunta del transmisor clásico de unas terminales presinápticas y los co-transmisores de otras; y no necesariamente por el co-almacenamiento y co-liberación desde las mismas terminales. La acción neuromodulatoria se explicaría entonces por la acción convergente ya sea pre o postsinápticamente de los mediadores una vez liberados.

OBJETIVO

Con el propósito de revisar el patrón morfológico de la co-transmisión ganglionar, así como explorar entre la posibilidad de que exista una población de NPS colinérgicas y no-colinérgicas, ó que estas NPS sintetizen ambos transmisores pero con una segregación a diferentes procesos axonales, estudiare por marcaje múltiple y análisis por microscopia confocal si las NPS de la médula espinal almacenan la misma combinación de transmisores (Ach con NT, m-ENK, CGRP, SS ó VIP) tanto en sus cuerpos celulares, como en sus axones y terminales sinápticas en el GE del gato.

Objetivos particulares

- Por marcaje retrógrado identificar en la médula espinal del gato las NPS que envían sus axones hacia el GE del gato.
- Estudiar la presencia, localización y posible co-existencia de ChAT y de los péptidos (NT, m-Enk, CGRP, SS y VIP) en los cuerpos celulares de las NPS, en la médula espinal del gato.
- Explorar la presencia y posible co-existencia de ChAT con los péptidos (NT, m-Enk, CGRP, SS y VIP) en los axones de las NPS, que se dirigen a través del tronco torácico simpático (TTS) a las células ganglionares del GE del gato.
- Explorar la presencia de ChAT, así como sus co-existencia con los péptidos (NT, m-Enk, CGRP, SS y VIP) en las fibras y botones del GE de gato.

MATERIAL Y METODOS

Se utilizaron gatos adultos indistintamente del sexo de entre 3 y 5 kg. para todos los experimentos, de acuerdo a los lineamientos bioéticos de manejo experimental de animales de la comisión de Bioética del Instituto de Investigaciones Biomédicas.

Procedimiento quirúrgico

En los experimentos crónicos de marcaje retrógrado, primero se anestesiaron a los animales con pentobarbital sódico (35 mg/Kg i.p. seguida de una dosis de mantenimiento de 3 mg/Kg i.v.), se entubaron endotraquealmente para aplicar, en caso necesario, ventilación artificial; se canalizó la vena femoral para la administración de las drogas y se midió la temperatura rectalmente, la cual se mantuvo entre 36 y 37°C con calor local. Después se localizó el tronco torácico simpático (TTS), se seccionó y por succión se introdujo el cabo distal al ganglio en un capilar de vidrio de 0.6 mm de diámetro el cual se llenó con el trazador fluoro-gold (3% en solución salina) y se dejó en contacto con el nervio preganglionar por espacio de una hora y después de retirar el capilar y confirmar la tinción del extremo del nervio, se cerraron las heridas y al término de 2-4 días de recuperación el gato se reanestesió, perfundió y fijó; después se extrajeron los segmentos torácicos **T2 a T6** de la médula espinal.

En los experimentos donde se interrumpió el transporte axonal, se localizó el TTS a nivel de **T3**, se amarró éste con un hilo de seda del número 6 y se cerraron las heridas. Después de 24 horas el gato se reanestesió para perfundirlo y fijarlo; por último se extrajo el cabo distal al GE.

Para la perfusión y fijación, los gatos se anestesiaron y se perfundieron transcardialmente con 300 ml de una solución amortiguadora de fosfatos (PBS 0.01 M

por 3 min, (seguida de 1000 ml de una solución PB 0.1 M) más paraformaldehído al 2% y ácido pícrico al 0.18%, pH 7.4 (300 ml en 3 min y 700 ml en 45 min). Después se extrajeron los segmentos T2 a T6 de la médula espinal, el TTS al nivel de T6 y T3 y los GE, los cuales se postfijaron en la misma solución fijadora (toda una noche), y finalmente se crioprotegieron en sacarosa al 30% hasta que el tejido alcanzara el fondo de la solución.

Inmunofluorescencia

Se hicieron cortes (10, 12, 14, 20 y 30 μm) en un crióstato a -20°C ; longitudinales de ganglio estelar, longitudinales y transversales de nervio preganglionar así como longitudinales y transversales de médula espinal. Los cortes se colocaron en laminillas recubiertas con acetona y silano al 2%, y se procesaron para inmunofluorescencia de acuerdo al siguiente procedimiento.

Para realizar el marcaje sencillo o múltiple, los cortes se incubaron con albúmina bovina al 5% (2 hrs), luego con el ó los anticuerpos primarios (por una ó dos noches), se realizaron dos lavados con PBS-Tx al 0.3% (10 min c/u), y por último se incubaron con los anticuerpos secundarios (2 hrs) acoplados a un fluorocromo, TxR, FITC ó Cy5. Algunos cortes de nervio se contratiñeron con fluoro-gold al 0.3%, con el propósito de identificar los axones de las NPS. Finalmente los tejidos se montaron con un medio de montar para fluorescencia (Vectashield) y se observaron en un microscopio de epifluorescencia Nikon Eclipse, con filtros para TxR (560 de excitación/ 585 nm de emisión), FITC, (488/522 nm) y UV, fluoro-gold (361/536 nm). Los anticuerpos que fueron utilizados y su origen, se presentan en las tablas 1 y 2.

Tabla 1. Anticuerpos primarios utilizados en el marcaje inmunofluorescente.

Dirigidos contra	Origen	Dilución	Marca
NT (sintético)	Rata	1:250, 1:500	Protos, Biotech, NY.
NT (oveja)	Conejo	1:200	Incstar, Stillwater, MN.
Met- Enk (oveja)	Conejo	1:200, 1:250	Donado por el Dr. Asai.
CGRP (sintético)	Conejo	1:100, 1:250	Diasorin, Stillwater, MN.
VIP (sintético)	Conejo	1:100, 1:250	Diasorin, Stillwater, MN.
SS (sintético)	Conejo	1:100, 1:250	Diasorin, Stillwater, MN.
ChAT (humano)	Cabra	1:200, 1:150	Chemicon
TH (rata)	Ratón	1:200	Chemicon

Tabla 2. Anticuerpos secundarios utilizados en el marcaje múltiple.

Dirigidos contra	Origen	Fluorocromo	Dilución	Marca
IgG de conejo	Cabra	FITC	1:250, 1:200	Sigma St. Louis
IgG de conejo	Rata	FITC	1:200	Zymed, CA
IgG de ratón	Cabra	FITC	1:200	Zymed, CA
IgG de rata	Cabra	FITC	1:200	Accurate, Westbury
IgG de ratón	Cabra	Cy5	1:200, 1:150	Zymed, CA
IgG de conejo	Cabra	Cy5	1:200, 1:250	Zymed, CA
IgG de cabra	Biotinilado de caballo	Avidina TxR	1:100	Vector, CA

Análisis confocal

Algunos cortes seleccionados por microscopia de epifluorescencia se observaron en un microscopio Zeiss acoplado a un sistema confocal (Zeiss Pascal LSM 510) con laser, de Kriptón y de Argón. De las regiones estudiadas se obtuvieron cortes ópticos seriados de 1–2 μm de grosor sobre el eje Z; las imágenes se colectaron en una, dos ó tres longitudes de onda según fuera simple, doble o triple marca, con las longitudes de onda correspondientes para TxR, FITC y Cy5 (647/680 nm). Se utilizaron pseudocolores, rojo (TxR), verde (FITC y fluoro-gold) y azul (Cy5). Las imágenes, fueron procesadas en un plano bidimensional, donde la colocalización existente en los tejidos se muestra con la sobreposición de las marcas originando los siguientes colores: amarillo (verde-rojo), violeta (rojo-azul), turquesa (verde-azul) y blanco (los tres colores).

RESULTADOS

1. Presencia de inmunorreactividad (IR) a ChAT en neuronas del asta intermediolateral de la médula espinal

El análisis por inmunofluorescencia contra ChAT, reveló cuerpos celulares de neuronas en las astas intermediolaterales de los segmentos torácicos 2 a 6 de la médula espinal. Las neuronas que se encontraron eran de forma oval, algunas pequeñas y redondas de aproximadamente 20-25 μm de diámetro. Estas neuronas se encontraron algunas veces aisladas y otras en grupos de 5 o más células, particularmente entre los núcleos IMLp e IMLf (**Figura 3**).

La naturaleza autonómica simpática de las neuronas marcadas en los núcleos IML de la médula, la confirmamos por el marcaje retrógrado con el trazador fluoro-gold, el cual se detectó en varias de las neuronas IR a ChAT localizadas preferentemente en el asta intermediolateral (**Figura 3 y 4**). Las neuronas, localizadas en las astas anteriores de la médula espinal también fueron ChAT positivas; estas neuronas no se marcaron con el trazador retrógrado y dado su mayor tamaño muy probablemente corresponden a las motoneuronas de músculo esquelético.

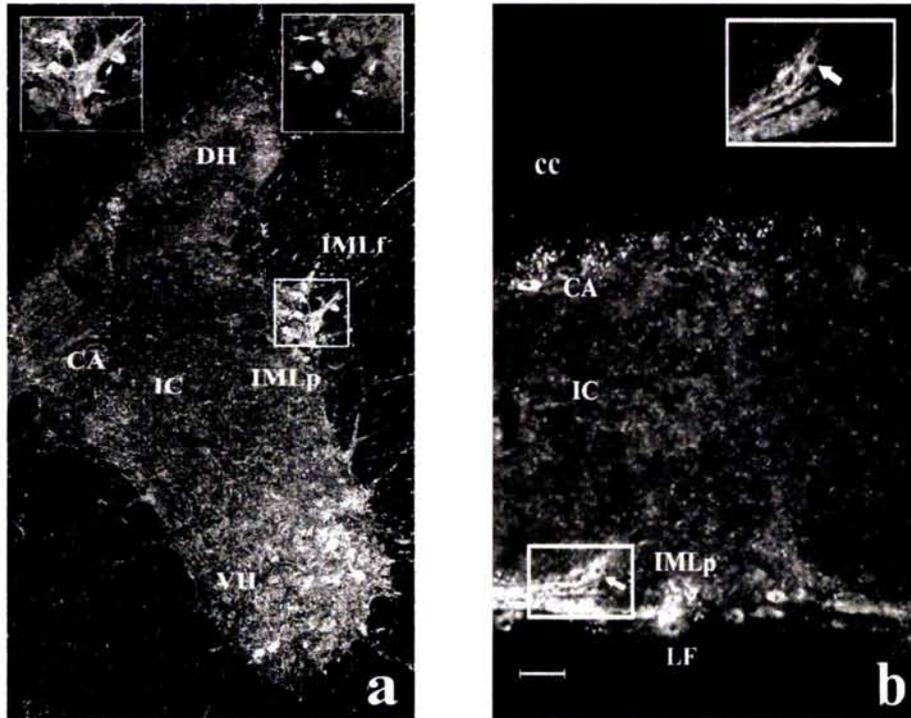


Figura 3. Regiones de médula espinal. En **a** se muestra un corte transversal, mostrando la ubicación del asta intermediolateral; en la esquina superior (izquierda) hay un recuadro que muestra a mayor aumento las NSP IR a ChAT, y en la esquina superior (derecha) aparece otro recuadro donde se muestran algunas neuronas positivas a ChAT, marcadas con el trazador fluoro-gold (flechas gruesas), y otras más sin fluoro-gold (flechas delgadas). En **b** aparece un corte longitudinal, donde se observan que la mayoría de las NSP se encuentran en IMLp. Asta dorsal (DH), asta ventral (VH), área central autonómica (CA), núcleo intercalado (IC), intermediolateral pars principalis (IMLp), pars funicularis (IMLf), funículo lateral (LF) y canal central (cc). Barra de calibración: 100 μ m.

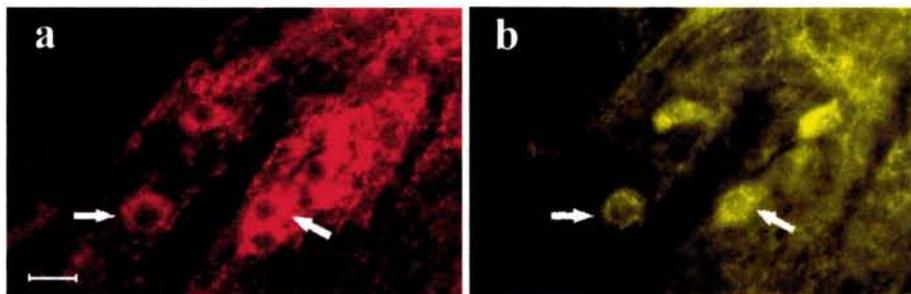


Figura 4. Imágenes de inmunofluorescencia en un corte longitudinal de médula espinal de gato. En **a** se muestran los somas de unas NPS IR a ChAT y en **b** se muestran los mismos somas marcados con el trazador retrógrado fluoro-gold, aplicado en los axones preganglionares que se dirigen a través del TTS hacia el GE. Barra de calibración: 50 μ m.

2. IR a ChAT y a los neuropéptidos NT, m-Enk, CGRP, SS y VIP en los cuerpos celulares de las NPS

Por marcaje simultáneo doble fluorescente contra ChAT y los neuropéptidos NT, m-Enk, CGRP, SS y VIP, analizado por microscopia de fluorescencia y confocal, encontramos que todos los neuropéptidos explorados co-localizan con ChAT, en los cuerpos celulares de las NPS (**Figura 5**).

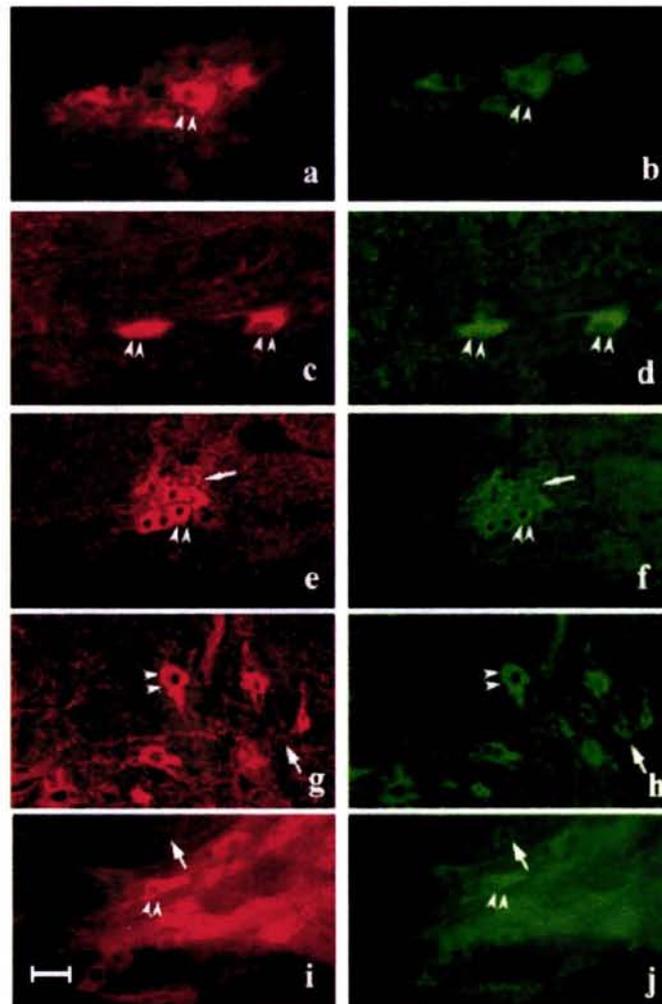


Figura 5. Imágenes de inmunofluorescencia donde se muestra doble inmunomarca en los somas de las NPS, tanto de cortes horizontales como transversales. En la columna de la izquierda (**a, c, e, g e i**) se muestran las NPS marcadas con TxR para ChAT. En los paneles de la derecha se muestran las neuronas marcadas con FITC IR a NT (**b**); m-Enk (**d**); CGRP (**f**); SS (**h**) y VIP (**j**). En todos los casos se señalan los somas de las NPS para mostrar clara co-localización de los transmisores explorados (cabezas de flechas), así como algunas neuronas positivas a los péptidos pero no a ChAT (flechas gruesas); también se muestra una neurona positiva a ChAT y negativa a un péptido (flecha delgada). Barra de calibración: 50 μm (a, b, c, d, i y j) y 100 μm (e, f, g, h).

Se encontraron algunas neuronas positivas a péptidos y no a ChAT, fuera de los núcleos intermediolaterales, que no fueron marcadas retrógradamente. La marca fluorescente de los péptidos NT, CGRP, SS y VIP en los somas de las NPS fue evidente, a diferencia del péptido m-Enk en donde la intensidad de la IR fue baja. Además de las NPS, las motoneuronas de las astas anteriores fueron positivas a la NT y m-Enk; este último péptido también presentó IR en fibras del asta dorsal. Para CGRP, en los cortes transversales además de la marca de las NPS, se observó una fuerte IR en las fibras de las astas dorsales.

3. Localización independiente de IR a ChAT y a los neuropéptidos NT, m-Enk, CGRP y VIP en terminales axónicas preganglionares del GE del gato

Como se había reportado anteriormente (Jiménez et al, 2002), confirmamos la IR a ChAT en las terminales axónicas preganglionares del GE del gato. Así mismo, encontramos IR a los neuropéptidos NT, m-Enk, CGRP, SS y VIP en las terminales axónicas preganglionares del GE del gato. Con marcaje doble simultáneo contra ChAT y cada uno de los péptidos explorados y análisis confocal encontramos, con excepción de la SS, localización independiente de ChAT y péptidos en botones y terminales presinápticas.

Con marcaje doble encontramos terminales axónicas preganglionares IR a NT que no contenían ChAT; la m-Enk fue observada en terminales axónicas las cuales no coincidían con las que presentaban IR a ChAT. Las terminales axónicas IR a CGRP se encontraron a lo largo del GE, pero además no correspondían con las terminales IR a ChAT; para este péptido se observaron dos tipos de fibras, unas gruesas lisas y otras delgadas con varicosidades. La SS fue el único péptido explorado que mostró co-localización con ChAT en las terminales axónicas. Finalmente también por

inmunorreactividad detectamos la presencia de terminales axónicas positivas a VIP pero no a ChAT (**Figura 6**).

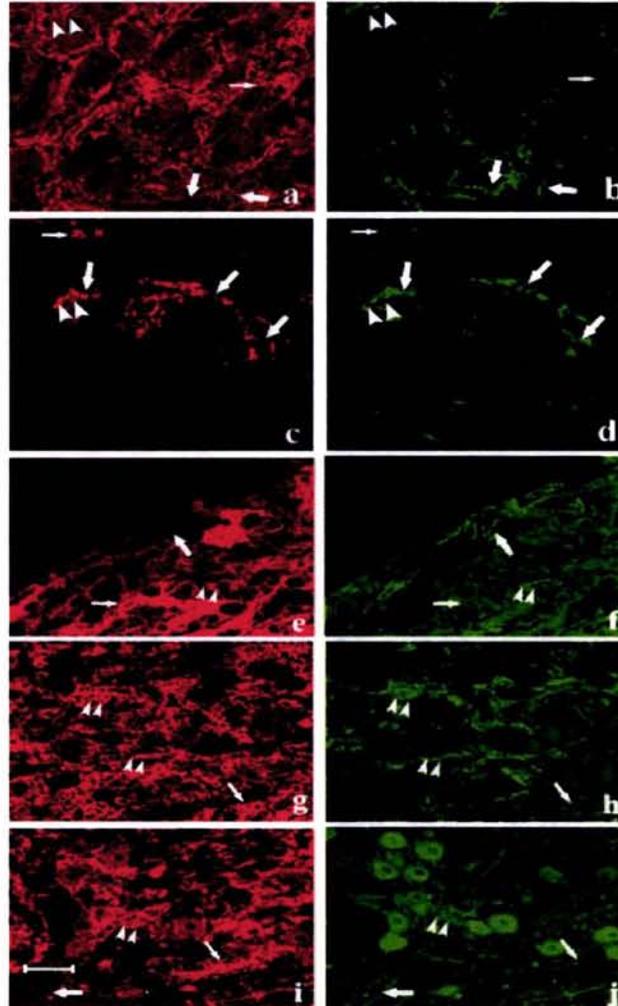


Figura 6. Imágenes de inmunofluorescencia que muestran una doble inmunomarca en el GE del gato. En el panel izquierdo se muestra (rojo) terminales IR a ChAT marcadas con TxR (**a, c, e, g e i**), en el panel derecho se representa la IR marcada con FITC para los péptidos NT (**b**), m-Enk (**d**), CGRP (**f**), VIP (**h**) y SS (**j**). Se muestra la presencia de cúmulos de fibras y botones preganglionares reactivos a ChAT y no a los péptidos (flechas delgadas), positivos a péptidos pero ChAT negativos (flechas grandes) y co-localización de ChAT y los péptidos (cabezas de flechas). Barra de calibración: 50 μm (a y b) 30 μm (c y d) y 100 μm (e, f, g, h, i y j).

Adicionalmente, en las neuronas ganglionares detectamos IR a ChAT, las cuales se encontraron rodeadas de terminales axónicas preganglionares IR también a ChAT; de igual forma también se detectaron células ganglionares positivas para m-Enk, CGRP y VIP; para estos dos últimos péptidos se encontró una intensa IR distribuida en todo el citoplasma de la célula ganglionar.

4. Presencia de IR a ChAT y a los neuropéptidos NT, m-Enk, CGRP y VIP en los axones preganglionares del Tronco Torácico Simpático (TTS)

Con el propósito de determinar si en efecto los puntos inmunofluorescentes encontrados en el TTS corresponden al axoplasma de las fibras nerviosas, los cortes transversales del nervio preganglionar se contratiñeron con fluoro-gold el cual marcó específicamente a la vaina de mielina, de tal manera que al observar la doble marca (ChAT y fluoro-gold), se pudo constatar que los puntos inmunofluorescentes corresponden al axoplasma, ya que siempre se encontraron en el interior de los anillos de mielina (**Figura 7**).

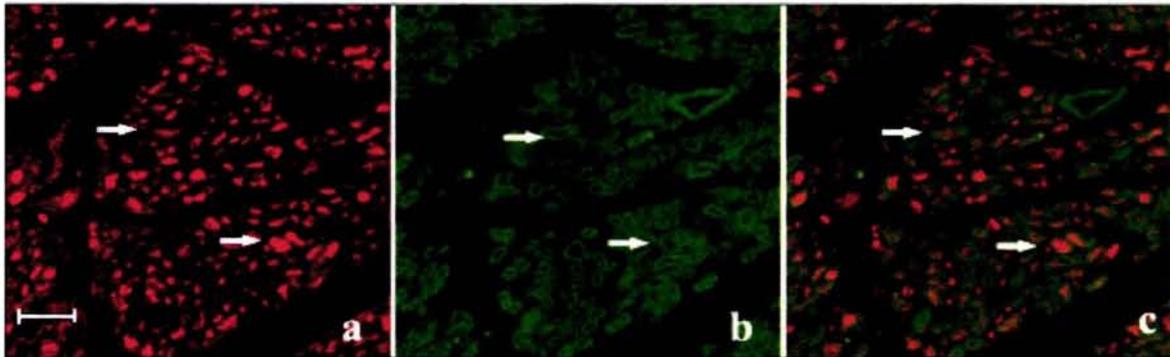


Figura 7. Imágenes obtenidas por microscopia confocal de cortes transversal de nervio preganglionar T3 contrastado con el trazador fluoro-gold. En **a** se muestran los axones IR a ChAT, en **b** se observó con el filtro para FITC la marca de fluoro-gold la cual se encontró en la mielina de los axones; en **c** ambos canales, los puntos IR a ChAT se encontraron precisamente en el interior de los anillos de la marca de la mielina (flechas). Barra de calibración: 5 μ m.

Por medio de inmunofluorescencia encontramos IR a ChAT en los axones preganglionares localizados en el TTS al nivel de **T3 y T6**; así como de los péptidos NT, m-Enk, CGRP y VIP; SS no alcanzó niveles detectables. La doble inmunofluorescencia mostró escasa co-localización de ChAT con los péptidos NT, m-Enk, CGRP y VIP (**Figura 8**).

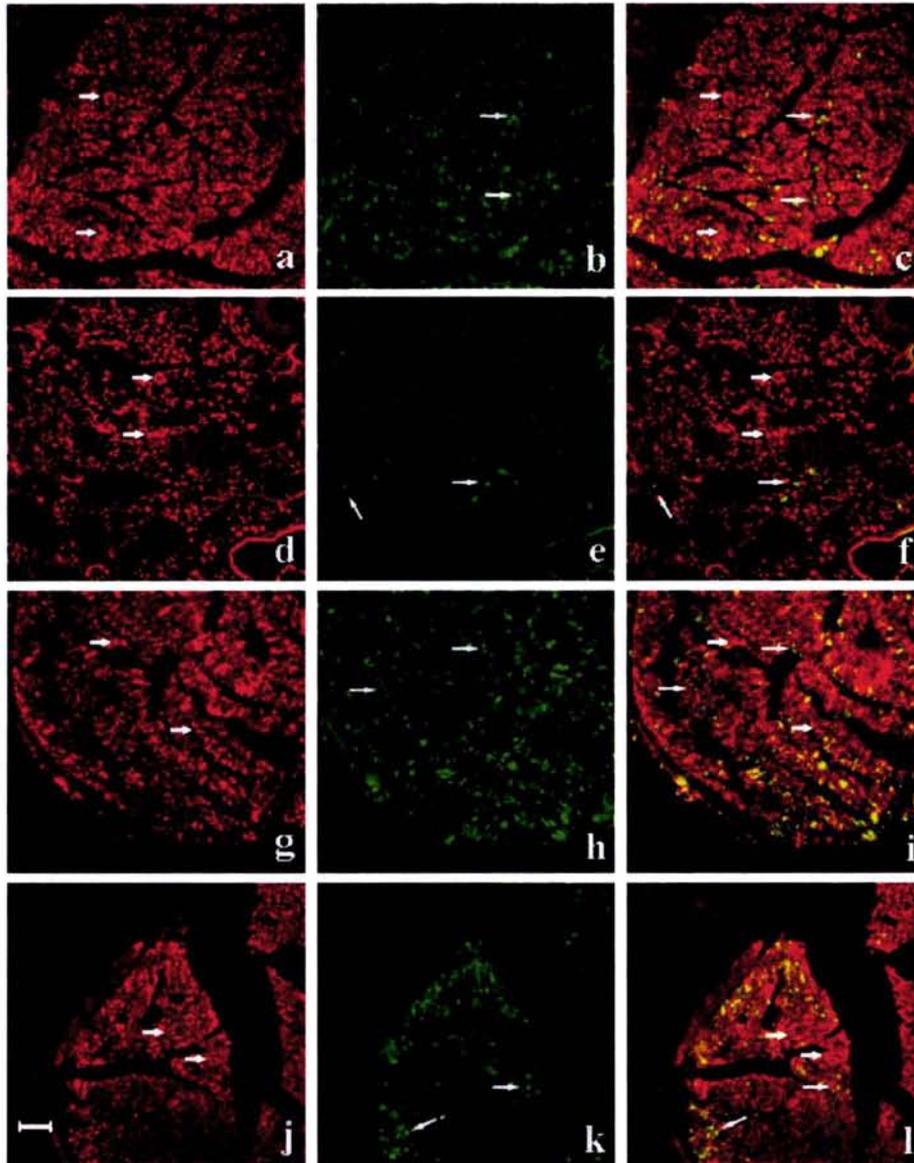


Figura 8. Cortes transversales de nervio preganglionar T3; las imágenes obtenidas por microscopia confocal muestra una doble marca simultánea para ChAT, CGRP y VIP. En la primera columna (rojo) se observa la IR a ChAT (**a, d, g y j**), en la segunda NT (**b**), m-Enk (**e**), CGRP (**h**), VIP (**k**) y la mezcla digital de los canales se presenta en la columna derecha ChAT-NT (**c**) y ChAT-m-Enk (**f**), CGRP (**i**) y VIP (**l**). Se observa localización independiente de estos péptidos en los axones preganglionares, ChAT (flechas pequeñas) y péptidos (flechas grandes). Barra de calibración: 12 μ m.

Considerando que ChAT co-localiza con estos péptidos en los cuerpos celulares, y que las NPS tienen un sólo axón, este resultado inesperado de localización independiente de ChAT y los péptidos nos condujo a explorar la posibilidad de que estos mediadores fueran transportados de manera secuencial. Para explorar esta posibilidad se obtuvieron cortes longitudinales de nervio preganglionar al nivel de T3, con marcaje doble inmunofluorescente (contra ChAT y NT), análisis confocal y reconstrucción tridimensional de las fibras preganglionares, observamos que a lo largo de las fibras la IR de los transmisores muestran un patrón de segmentación sucesiva en forma de anillos de las diferentes reactividades (**Figura 9 y 10**).

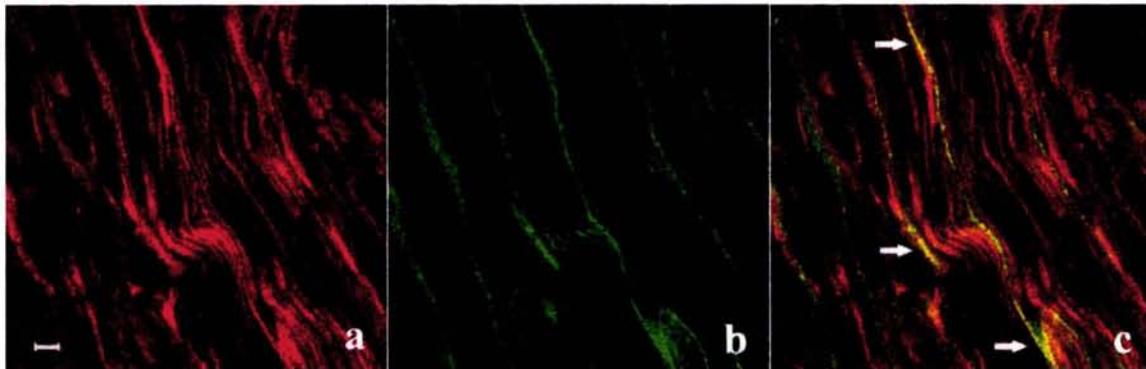


Figura 9. Corte longitudinal de nervio preganglionar T3. Imágenes obtenidas por microscopia confocal, donde se muestra una doble inmunomarca para ChAT (**a**) y NT (**b**), la sobreposición de ambos canales se muestra en **c**. Se puede observar cómo a lo largo de las fibras preganglionares la IR de ambos transmisores se muestra como un patrón de segmentación sucesiva en forma de anillos (flechas). Barra de calibración: 5 μ m.

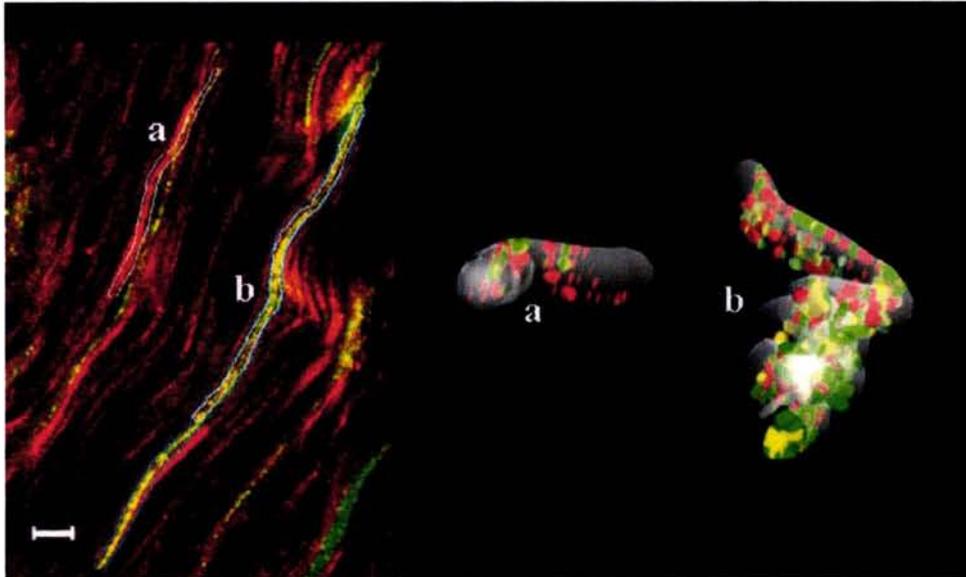


Figura 10. Imágen de una reconstrucción ridimensional de la localización de transmisores en las fibras preganglionares. A la izquierda se muestra la Imágen de un corte longitudinal de nervio preganglionar obtenida por microscopia confocal (ChAT-rojo y NT-verde). Los segmentos seleccionados de las fibras preganglionares **a** y **b** tienen su imágen tridimensional correspondiente a la derecha. Se puede observar tanto en **a** como en **b** que a lo largo de las fibras preganglionares la IR de los transmisores se presenta como un patrón de segmentación sucesiva en forma de anillos, con escasos puntos de co-localización. Barra de calibración: 5 μ m.

Adicionalmente, realizamos experimentos donde se interrumpió el transporte axonal en el TTS (**T3**), con el fin de determinar si, al acumularse los transmisores en el sitio de la interrupción, se pudieran detectar co-localizados. Se obtuvieron cortes del cabo distal al ganglio (**T3**) y por marcaje múltiple fluorescente y análisis confocal, se encontró, que en efecto los transmisores se acumularon en los axones preganglionares mostrando un claro aumento de los puntos de co-localización, lo cual fue más evidente para ChAT y NT (**Figura 11**). Estos resultados apoyan la posibilidad de que los transmisores se transportan de manera secuencial; lo que pudiera indicar que al realizar los cortes transversales el observar o no co-localización en los axones depende a qué nivel de cada nervio pasa el corte.

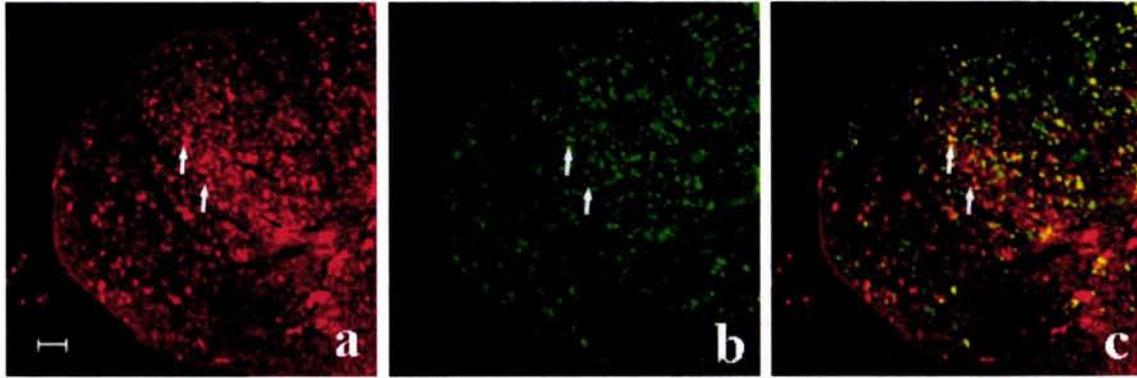


Figura 11. Imágenes obtenidas por microscopia confocal de cortes transversales de nervio preganglionar ligado 24 hrs antes. Se muestra doble inmunomarca contra ChAT (a), NT (b) y la sobre posición de los dos canales (c) donde se observan abundantes sitios de co-expresión (puntos amarillos) de transmisores en los axones preganglionares (flechas). Barra de calibración: 20 μ m.

Por otra parte, en cortes transversales del TTS con tinción de azul de toluidina encontramos a nivel de T3 (2-5 mm del GE), además de las fibras preganglionares un gran número de neuronas ganglionares ectópicas. Estas neuronas son positivas a TH (hidroxilasa de tirosina), llegan a ocupar hasta el 50% del área total del nervio; mientras que en T6 (11-13 mm del GE) sólo se encontraron fibras nerviosas IR a ChAT (**Figura 12**).

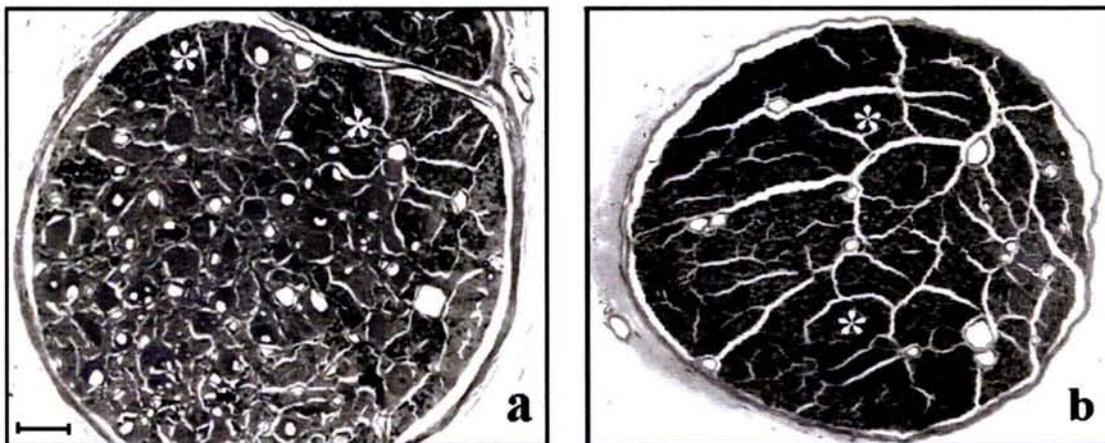


Figura 12. Cortes de nervio preganglionar T3 y T6 contrateñido con azul de Toluidina. En a se observa que además de las fibras preganglionares (asteriscos), más del 50% del nervio en T3 está ocupado por neuronas ganglionares ectópicas (flechas). En b se muestra un corte de nervio T6 en el cual se observan prácticamente sólo fibras axónicas preganglionares (asteriscos). Barra de calibración: 125 μ m.

DISCUSION

Los datos de este trabajo demuestran la presencia de ChAT y de los neuropéptidos NT, m-Enk, SS, CGRP y VIP en las neuronas preganglionares simpáticas del gato. Encontramos que ChAT co-localiza con cada uno de los péptidos estudiados en los cuerpos celulares pero con excepción de SS, esta co-localización no se encuentra en las fibras y botones axónicos. A nivel del nervio preganglionar en el TTS, tampoco se encontró co-localización, aunque esta si se encontró al interrumpir el transporte axónico.

Estos resultados sobre localización y co-localización del transmisor principal Ach y los neuropéptidos en los somas de las NPS coinciden con los datos publicados por Kondo y Colombo-Benkmann (Kondo et al, 1985; Colombo et al, 1995) quienes reportaron la co-existencia de ChAT con Enk en los cuerpos celulares de las NPS; además demostramos que los péptidos NT, CGRP, SS y VIP también co-existen con ChAT, lo cual nos sugiere que dichas neuronas pueden sintetizar Ach y diferentes péptidos.

En los botones y terminales axónicas preganglionares en el GE confirmamos la presencia e IR independiente de la Ach, NT y m-Enk en botones sinápticos, como había sido reportado (Jiménez et al, 2002). Además, también encontramos localización independiente de ChAT, CGRP y VIP; la SS fue el único péptido que presentó co-localización con la ChAT. El origen preganglionar de estos botones terminales se ha comprobado denervando el ganglio estelar, lo que produce la desaparición de la inmunorreactividad de los transmisores (Jiménez et al, 2002).

Debido a la co-expresión de ChAT y los péptidos en el cuerpo celular pero no en botones y terminales de las NPS, decidimos explorar la localización de transmisores en los axones de las NPS en el nervio preganglionar simpático. Esto es,

tomando en cuenta que las NPS tienen un sólo axón, lo esperado era que los transmisores una vez sintetizados viajaran por el transporte axónico hacia los ganglios simpáticos; por lo que deberían encontrarse co-localizados en los nervios preganglionares; sin embargo, nuestros datos mostraron más bien localización separada de la ChAT y los péptidos explorados, lo que nos llevó a considerar la posibilidad de que estos transmisores una vez sintetizados se transportaran secuencialmente a través de los axones. Para probar esta posibilidad realizamos cortes longitudinales del nervio preganglionar, en los cuales observamos, tanto para ChAT como para NT un patrón de distribución sucesiva en forma anillos a lo largo de los axones, y basándonos en los experimentos realizados en los años 40 por Weiss y colaboradores (para revisión ver: Nicholls et al, 2001) en relación con el transporte axonal, interrumpimos el transporte anterógrado, esto es de la médula espinal al GE, simplemente haciendo una ligadura en el nervio preganglionar; fue de esta manera, que al inducir la acumulación de los transmisores en el sitio de ligadura logramos detectar co-existencia de los transmisores.

Nuestros datos, como otros previos (Lindh et al, 1986; Morales et al, 1995; Jiménez et al, 2002), apuntan a que las NPS co-expresan ChAT y varios péptidos a nivel de sus cuerpos celulares, estos mediadores se transportan separadamente por lo que no se encuentran co-localizados en los axones preganglionares, a menos que se interrumpa el transporte axónico, y son finalmente detectados mayoritariamente en botones y terminales axónicas separados. Esta discrepancia de co-localización de ChAT y péptidos en los cuerpos celulares y los botones y terminales axónicas de las NPS puede ser explicado por: i) por la existencia de una subpoblación de neuronas preganglionares simpáticas no colinérgicas pero con otro transmisor clásico, o bien que sean neuronas exclusivamente preganglionares peptidérgicas. Cabe señalar que

en las neuronas preganglionares, además de la Ach se han reportado otros transmisores clásicos como GABA, glutamato, (Nozdrachev et al, 2002; Dobó et al, 1989) entre otros. Sin embargo, todas las NPS que analizamos fueron ChAT positivas.

ii) que las NPS tengan la capacidad de sintetizar y almacenar transmisores y co-transmisores en sus cuerpos celulares, para después segregarlos de manera sucesiva a diferentes botones y terminales sinápticas. Esta posibilidad pudiera contravenir con un principio clásico dentro de las neurociencias, que se conoce como principio de Dale (Dale, 1935), el cual fue enunciado en realidad por John Eccles (Eccles, 1957), donde se sostiene que *las neuronas operan con la misma combinación de transmisores en todos sus procesos celulares*; sin embargo, aunque este principio ha sido aceptado de manera general por mucho tiempo, ya se han tenido reportes de segregación de transmisores a diferentes procesos celulares en diferentes niveles del SN (Sossin et al, 1990; Jonas et al, 1998; Landry et al, 2003), lo cual concuerda con nuestros resultados.

De nuestros datos podemos postular que la co-transmisión ganglionar se debe a la liberación conjunta de transmisores provenientes de diferentes terminales y la acción moduladora se ejercería por la convergencia presináptica y/o postsináptica de las acciones de cada mediador, y no por la liberación de uno o más mediadores de las mismas terminales presinápticas (**figura 13**).

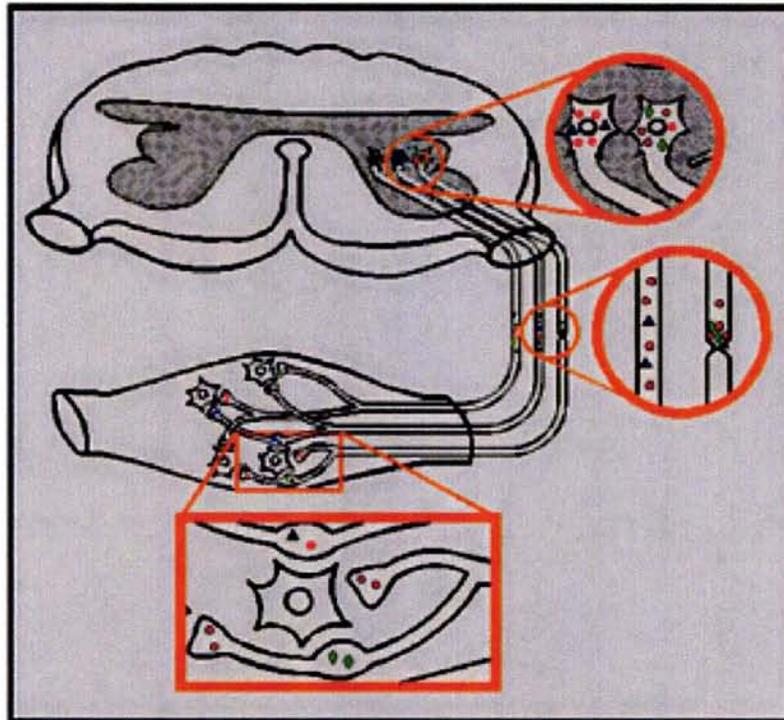


Figura 13. Esquema donde se muestran los cuerpos celulares de las NPS en las astas intermediolaterales de la médula espinal, desde donde parten sus axones hacia los ganglios simpáticos para hacer sinapsis con las células ganglionares. Las neuronas amplificadas muestran co-expresión de ACh (**círculos rojos**), y los diferentes neuropéptidos (**triángulos azules y rombos verdes**); los cuales son transportados diferencialmente a través de los axones y finalmente segregados a diferentes botones y terminales axónicas (**neuronas amplificadas del ganglio simpático**). La interrupción axónica (**amplificación en los axones de las neuronas**) produce la acumulación de los transmisores la cual se muestra como una co-existencia de los mismos en el nervio preganglionar.

Finalmente, nuestros hallazgos sugieren que las NPS pueden ser pluripotenciales es decir, sintetizar a la vez a los transmisores, transportarlos en una temporalidad diferente y segregarlos a diferentes terminales axónicas. Esta propuesta implicaría una considerable potencialidad de las neuronas preganglionares, de sintetizar, segregar, transportar y liberar separadamente diferentes transmisores, lo que pudiera ser transitorio, y estar además en función de los requerimientos de las sinapsis. Aunque esto último es simplemente una conjetura, es algo que no se puede dejar de considerar.

CONCLUSIONES

1. Las neuronas preganglionares simpáticas del GE de gato, localizadas en los núcleos intermediolaterales muestran co-expresión de la ChAT y los péptidos NT, m-Enk, CGRP, SS y VIP al nivel de sus cuerpos celulares.
2. Los transmisores explorados en el presente trabajo, son transportados a través de los axones preganglionares de manera sucesiva hacia los botones axónicos.
3. Los botones y terminales axónicas almacenan de manera independiente a los transmisores explorados.
4. La neuromodulación por lo tanto se podría ejercer por la acción conjunta de mediadores liberados de diferentes terminales presinápticas cuyas acciones convergerían pre y/o post-sinápticamente; y no por la liberación conjunta de transmisores provenientes de las mismas terminales axónicas.
5. Estos resultados podrían ser una excepción al principio de Dale, dado que estas neuronas tendrían la capacidad de segregar diferentes transmisores a distintos procesos celulares.

BIBLIOGRAFIA

1. Bachoo, M., Ciriello, J., and Polosa, C. **Effect of preganglionic stimulation on neuropeptide-like immunoreactivity in the stellate ganglion of the cat.** Brain Research. 400: 377-382. 1987.
2. Bean, A.J., Zhang, X., and Hökfelt, T. **Peptide secretion: what do we know?** The FASEB Journal. 8: 630-638. 1994.
3. Bear, M.F., Connors, B. W., and Paradiso, M.A. **Neuroscience, exploring the Brain.** Williams & Wilkins. USA, 1996.
4. Benarroch, E.E. **Neuropeptides in the sympathetic system: presence, plasticity, modulation, and implications.** Ann. Neurol. Vol. 3. No.1: 6-13. 1994.
5. Burnstock, G. **Do some nerve cells release more than one transmitter?** Neuroscience. Vol 1. No. 4: 239-248. 1976.
6. Burnstock, G. **Cotransmission.** Current opinion in Pharmacology. Vol 4 : 47-52. 2004.
7. Colombo-Benkmann, M., Heym, C. and Schemann, M. **Preganglionic sympathetic neurones, innervating the guinea pig adrenal medulla, immunohistochemically contain choline acetyltransferase and also leu-enkephalin.** Neuroscience letters. 190: 155-158. 1995.
8. Dale, H. **Pharmacology and nerve endings.** Proc. Roy. Soc. Med. 28: 319-332. 1935.
9. Dembowski, K., Czachurski, J., and Seller, H. **Morphology of sympathetic preganglionic neurons in the thoracic spinal cord of the cat: an intracellular horseradish peroxidase study.** The J. Comp. Neurol. 238: 453-465. 1985.
10. Dobó, E., Kása, P., Wenthold, R.J., Joó, F. And Wolf, J.R. **Evidence for GABA-ergic fibers entering the cervical superior ganglion of rat from nerve trunk.** Histochemistry. 92:133-136. 1989.
11. Eccles, J.C. **The physiology of nerve cells.** Johns Hopkins Press. Baltimore. 1957.
12. Elfvin, L.G., Lindh, B., and Hökfelt, T. **The chemical neuroanatomy of sympathetic ganglia.** Annu. Rev. Neurosci. 16:471-507. 1993.
13. Guyton, A.C. and Hall, J.E. **Tratado de fisiología médica.** Interamericana, McGraw-Hill. 9ª ed. México, 1998.

14. Heym, C., Liu, N., Gleich, A., Oberst, P., and Kummer, W. **Immunohistochemical evidence for different immunoreactive to substance P and calcitonin gene-related peptide (CGRP) in the guinea pig, stellate ganglion.** Cell Tissue Res. 272: 563:574. 1993.
15. Hökfelt, T., Holets, VR., Syines, W., Melander, T., Shalling, M., Shultzberg, M., Freedman, J., Björklund, H., Olson, L., Lindh, B., Elfvin, LG., Lundberg, JM., Lindgren, JA., Samuleson, B., Pernow, B., Terenius, L., Post, C., Everitt, B., and Goldstein M. **Coexistence of neuronal messengers-an overview.** Prog. In Brain Res. 68: 33-70. 1986.
16. Hökfelt, T. **Neuropeptides in perspective: the last ten years.** Neuron. 7: 867-879. 1991.
17. Jiménez, B. González, MA. y Morales, MA. **Código químico de la neurotransmisión.** Temas selectos de neurociencias II. Ed. Javier Velázquez Moctezuma, UAM-PUIS. 2001.
18. Jiménez, B., Mora-Valladares, E., Zetina, ME., and Morales, MA.. **Ocurrence, co-ocurrence and topographic distribution of choline acetyltransferase, met-enkephaline and neurotensin in the stellate ganglion of the cat.** Synapse. 43:163-174. 2002.
19. Johansson, O., and Lundberg, JM. **Ultrastructural localization os VIP-like immunoreactivity in large dense-core vesicles of cholinergic-type nerve terminals in cat exocrine glands.** Neuroscience. Vol. 6 No. 5: 847-862. 1981.
20. Jonas, P., Bischofberger, J. and Sandkhuler, J. **Corelease of two fast neurotransmitters at a central synapse.** Science. Vol. 281 No. 5375: 419-424. 1998.
21. Kondo, H., Kuramoto, H. Wainer, BH., and Yanaihara, N. **Evidence for the coexistence of acetylcholine and enkephaline in the sympathetic preganglionic neurons of rats.** Brain Research. 335: 309-314. 1985.
22. Kummer, W. and Heym, C. **Neuropeptide distribution in the cervico-thoracic paravertebral ganglia of the cat with particular reference to calcitonin gene-related peptide immunoreactivity.** Cell Tissue Res. 252: 463-471. 1988.
23. Kummer, W. and Heym, C. **Different types of calcitonin gene-related paptide-immunoreactive neurons in the guinea-pig stellate ganglion as revealed by triple-labeling immunofluorescence.** Neuroscience letters. 128: 187-190. 1991.
24. Krukoff, T., Ciriello, J., and Calaresu, R. **Segmental distribution of peptide-like immunoreactivity in cell bodies of the thoracolumbar sympathetic nuclei of the cat.** The J. Comp. Neurol. 240: 90-102. 1985.

25. Krukoff, T. **Coexistence of neuropeptides in sympathetic neurons of the cat.** Peptides. 8: 109-112. 1987.
26. Lamotte, CC., and Lanerolle, NC. **VIP terminals, axons, and neurons: distribution throughout the length of monkey and cat spinal cord.** The J. Comp. Neurol. 249:133-145. 1985.
27. Landry, M., Vila-Porcile, E., Hökfelt, T. and Calas A. **Differential routing of coexisting neuropeptides in vasopressin neurons.** European Journal of Neuroscience. 17: 579-589. 2003.
28. Lee, Y., Hayashi N., Hillyard, CJ., Girgis, SI., MacIntyre, I. Emson, PC., and Tohyama, M. **Calcitonin gene-related peptide-like immunoreactive sensory fibers form synaptic contact with sympathetic neurons in the rat celiac ganglion.** Brain Research. 407: 149-151. 1987.
29. Lindh, B., Staines, W., Hökfelt, T., Terenius, L. And Salvaterra, PM. **Immunohistochemical demonstration of choline acetyltransferase-immunoreactive preganglionic nerve fibers in guinea pig autonomic ganglia.** Proc. Natl. Acad. Sci. USA Vol. 83: 5316-5320. 1986.
30. Lindh, B., Lundberg, JM., Hökfelt, T., Elvin, LG., Fahrenkrug, J., and Fisher, J. **Coexistence of CGRP- and VIP-like immunoreactivities in a population of neurons in the cat stellate ganglia.** Acta Physiol. Scand. 131: 475-476. 1987.
31. Lindh, B., Haegerstrand, A., Lundberg, JM., Hökfelt, T., Fahrenkrug, J., Cuello, AC, Graffi, J., and Massoulié, J. **Substance P-, VIP- and CGRP-like immunoreactivities coexist in a population of cholinergic postganglionic sweat glands in the cat.** Acta Physiol. Scand. 134: 569-570. 1988.
32. Lindh, B., and Hökfelt, T. **Structural and functional aspects of acetylcholine peptide coexistence in the autonomic nervous system.** Prog. Brain Research. 84: 175-574. 1990.
33. Morales, MA., Holmberg, K., Xu, ZQ., Cozzari, C., Hartman, BK., Emson, P., Goldster, M., Elfvin, LG., and Hökfelt, T. **Localization of choline acetyltransferase in rat peripheral sympathetic neurons and its coexistence with nitric oxide synthase and neuropeptides.** Proc. Natl. Acad. Sci. 92: 11819-11823. 1995.
34. Morales, MA., Sámano, C., Cifuentes, F., and Zetina, ME. **Segregation of choline acetyltransferase, and neuropeptides in separate axonal fibres within sympathetic preganglionic neurons of the cat.** VI International Brain Research Organization, (IBRO); Congress World of Neuroscience. Prague, Czech Republic, July 10-15, 2003
35. Nicholls, JG., Martin, AR., Wallace, BG., Fuchs, PA. **From neuron to brain.** Sinauer Associates, Inc. 4^a ed. USA, 2001.

36. Nozdrachev, AD., Jiménez, B., Morales, MA. and Fateev, MM. **Neuronal organization and cell interactions of the cat stellate ganglion.** Autonomic Neuroscience: Basic & Clinical. 95: 43-56. 2002.
37. Purves, D., Augustine, G.J., Fitzpatrick, D., Katz, L.C., LaMantia, A.S., McNamara, J.O. and Williams, S.M. **Neuroscience.** Sinauer associates, Inc. 2^a ed. USA, 2001.
38. Sámano, C., Morales, MA. And Zetina, ME. **Different patterns of co-storage between acetylcholine and peptides in preganglionic sympathetic neurons.** 32º Annual Meeting Scientific for Neuroscience. (SFN). Orlando, Fl, USA, November 2-7, 2002
39. Sossin, WS., Sweet-Cordero, A., and Scheller RH. **Dales hypothesis revised: differential neuropeptides derived from a common precursor are targeted to different processes.** Proc. Natl. Acad. Sci. 87: 4845-4848. 1990.
40. Senba, E., Tohyama, M. **Calcitonin gene-related peptide containing autonomic efferent pathways to the pelvic ganglia of the rat.** Brain research. 449: 386-390. 1988.
41. Shafton, AD., Oldfield, BJ and McAllen, RM. **CRF-like immunoreactivity selectively labels preganglionic sudomotor neurons in cat.** Brain Research. 599: 253-260. 1992.
42. Wanaka, A., Matsuyama, T., Yoneda, S., Kamada, T., Shibasaki, T., Hayakawa, T., Tohyama, M. **Corticotropin-releasing factor-like immunoreactive nerve fibers in the rat superior cervical ganglion and their fine structures.** Brain research. 435: 91-96. 1987.
43. Wilson, P., Stewart and Akesson. **Autonomic Nerves.** B.C. Decker INC. Canada, 1997.