



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

DOCTORADO EN CIENCIAS BIOMÉDICAS

INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS

**CAMBIOS EN LA NEUROPLASTICIDAD SIMPÁTICA DURANTE EL
DESARROLLO DE LA HIPERTENSIÓN DE LA RATA
ESPONTÁNEAMENTE HIPERTENSA (SHR) DEPENDIENTES DE
GABA Y DE REGIONALIZACIÓN INTRAGANGLIONAR**

T E S I S
QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
DOCTOR EN CIENCIAS

P R E S E N T A:
LUIS ANDRÉS MARTÍNEZ ZALDÍVAR

DIRECTOR DE TESIS:
DR. MIGUEL ÁNGEL MORALES MENDOZA
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS

COMITÉ TUTOR:
DR. ARTURO HERNÁNDEZ CRUZ
INSTITUTO DE FISIOLÓGÍA CELULAR
DR. SANTIAGO VILLAFANA RAUDA
ESCUELA SUPERIOR DE MEDICINA, IPN.

CDMX.

OCTUBRE DE 2019



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.

*Estudía mucho lo que sea de interés para tí y hazlo de la forma más
indisciplinada, irreverente y original posible.*

Richard P. Feynman.

AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por la beca de doctorado otorgada para la realización de este proyecto (beca #306013).

Este trabajo fue financiado por DGAPA-PAPIIT (Convenio # IN210515 y # IN213919) y CONACYT-México (Convenio # 236903).

A las instituciones donde se desarrolló y proporcionaron los recursos para el proyecto.



A mi padre y madre Luis y Estela, quienes incondicionalmente, con mucho esfuerzo y cariño, me han impulsado a desarrollarme en todos aspectos. Me enseñaron que el pilar fundamental es la familia y cualquier logro, por reducción a lo absurdo, también lo es.

A mis hermanos Bola y Nana por compartir todos estos años en donde nos hemos visto caer y crecer, al final juntos.

A Emi con quien comparto risas, juegos, cariño, admiración, aprendizaje... en este momento de formación no queda más que echarle muchas ganas. Siempre se puede salir adelante.

A Isabel, desde hace algunos años ha sido mi compañera de vida, desvelos, presentaciones previas a los tutorales y congresos, participando con sus valiosos comentarios y críticas.

A mis amigos.

Al Dr. Miguel Ángel Morales por ser un excelente líder de investigación que compartió de su vasto conocimiento en el desarrollo de este proyecto. Por dedicar tiempo y esmero ante las dudas que fueron surgiendo. Es un investigador objetivo e imparcial que me impulso a mejorar en todos los ámbitos académicos.

Al Dr. Arturo Hernández por estar presente en cada uno de los exámenes y evaluaciones a lo largo de este camino haciendo más llevadero el estrés que genera.

Al Dr. Santiago Villafaña al ayudarme a resolver dudas relacionadas con temas en los que no dominaba.

Al Dr. Fredy Cifuentes que tiene amplios conocimientos en bioquímica, electrónica y programación. Su contribución en el desarrollo de este proyecto fue fundamental. Cuando tomaba parte de su tiempo para charlar de bicicletas y café.

A Maria Elena por su trabajo, su empatía con todos los integrantes del equipo y sus magníficas historias de vida. Una gran mujer.

A Pedro Medina por el compromiso que tiene con los estudiantes, quien gustoso de hacerlo nos ayudaba en lo que necesitáramos. Siempre curioso por conocer más y más.

A mis compañeros de laboratorio por la retroalimentación, por hacer llevaderos los momentos duros.

Gracias a todos

ABREVIATURAS

ACh: Acetilcolina

Ca_i²⁺: Calcio Libre Intracelular

Cl⁻: Cloro

EPSC: Corriente postsináptica excitatoria

EPSP: Potencial posináptico excitatorio

GABA: Ácido Amino Gamma Aminobutírico

GABAA: Receptor GABA subunidad A

GABAB: Receptor GABA subunidad B

GABAC: Receptor GABA subunidad C

GAD: Ácido Glutámico Descarboxilasa

GCS: Ganglio cervical superior

HTA: Hipertensión arterial

LTP: Potenciación a Largo Plazo

LTPg: Potenciación Ganglionar a Largo Plazo

NCE: Nervio Carotídeo Externo

NCI: Nervio Carotídeo Interno

NE: Norepinefrina

NPY: Neuropeptido Y

PAC: Potencial de Acción Compuesto

PAS: Presión Arterial Sistólica

PTP: Potenciación Post-tetánica

SHR: Rata espontáneamente hipertensa

SNA: Sistema Nervioso Autónomo

SNC: Sistema Nervioso Central

SNS: Sistema Nervioso Simpático

VGAT: Transportador Vesicular de GABA

WKy: Rata Wistar Kyoto

ÍNDICE

Resumen	1
Introducción	2
El sistema nervioso simpático	2
Ganglio cervical superior	2
Ácido gamma aminobutírico	2
Receptores GABA _A sinápticos y extrasinápticos	3
Hipertensión Arterial	3
El modelo de la rata espontáneamente hipertensa (SHR)	5
Antecedentes	7
Planteamiento del problema	10
Hipótesis	10
Objetivos	10
Materiales y métodos	11
Animales	11
Procedimiento experimental	11
Registros electrofisiológicos	11
Agentes farmacológicos	12
Análisis de datos	13
Medida de la presión arterial	13
Estadística	13
Resultados	15
Aumento de la presión arterial en la rata SHR de 12 semanas	15

Las neuronas rostrales del GCS de las ratas SHR jóvenes prehipertensas expresaron la LTP evocada por el tren de alta frecuencia, mientras que los GCS de las ratas SHR adultas hipertensas no la expresaron	15
Los GCS de la SHR de 8 semanas expresaron LTP	20
La expresión de la LTPg mostró una regionalización en el GCS. Fue mayor en las neuronas caudales que en las rostrales de la rata Wistar	21
La LTP se expresó diferencialmente en las neuronas rostrales y caudales del GCS de las ratas adultas SHR y WKy	22
La expresión de la LTPg mostró diferencias regionales en el GCS de las ratas SHR prehipertensa de 6 semanas y las ratas WKy de la misma edad	25
El bloqueo de los receptores del subtipo GABA _A en el GCS recupera la expresión de la LTP en las neuronas rostrales de la SHR hipertensa adulta	27
La expresión de la LTPg evocada con un tren de 10 Hz se comporta de manera similar que la LTPg evocada con 40 Hz	29
Tabla 1. Expresión de la LTPg en las diferentes condiciones experimentales estudiadas	32
Discusión	33
Conclusiones	39
Referencias	41
Anexos	49
Artículo publicado 13/10/2019	50
Artículo en proceso de publicación	60

ABSTRACT

The sympathetic nervous system (SNS) regulates body functions in normal and pathological conditions. Some characteristics of the SNS are the presence of synaptic plasticity, like ganglionic long-term potentiation (gLTP), and sympathetic rhythms, among others. The presence of sympathetic hyperfunction, such as increase in the plasma level of noradrenaline, elevated sympathetic outflow, and changes in synaptic plasticity of autonomic ganglia, have been observed in human hypertensive patients and in spontaneously hypertensive rats (SHR). It is known that sympathetic hyperfunction precedes hypertension. Here, we explored in the rat superior cervical ganglia whether gLTP was altered before the onset of hypertension. We explored if gLTP showed regional differences and a possible role for GABA. We studied gLTP expression and the effect of bicuculline, a GABA antagonist, in rostral and caudal regions of the superior cervical ganglion of SHR and Wistar Kyoto (WKy) rats at 12 (adult) and 6 (young) week-old. We found that gLTP was not expressed in the rostral region of adult SHR, however, it was expressed in this region in young SHR, but not in young WKy rats. Interestingly, the caudal region of adult SHR expressed gLTP. Bicuculline unmasked gLTP in the rostral region of adult SHR and of young WKy rats. We propose the following: a) sympathetic SHR ganglia modify their synaptic plasticity prior to the onset of hypertension; b) Neuroplastic changes varies according to the intraganglionic region explored c) endogenous GABA modulates sympathetic neuroplasticity; and d) these changes in neuroplasticity preceding hypertension could be part of the sympathetic overactivity observed in this disease.

RESUMEN

El sistema nervioso simpático (SNS) regula muchas funciones vitales del cuerpo en condiciones normales y patológicas. Algunas características del SNS son la presencia de ritmos simpáticos y de plasticidad sináptica, como la potenciación a largo plazo (LTPg), entre otros. En humanos hipertensos y en las ratas espontáneamente hipertensas (SHR) se ha observado la presencia de hiperfunción simpática, como aumento en el nivel plasmático de noradrenalina, aumento en la actividad eferente simpática y cambios en la plasticidad sináptica de los ganglios autónomos. Se sabe que la hiperfunción simpática precede a la hipertensión arterial (HTA). En esta tesis exploramos si la LTPg en el ganglio cervical superior (GCS) de la rata SHR se altera antes del inicio de la HTA en ratas de 6 semanas de edad. También estudiamos posibles diferencias regionales ganglionares y la participación del ácido amino gamma aminobutírico (GABA) en la expresión de la LTPg de las ratas SHR. Investigamos la expresión de la LTP y la modulación GABAérgica en la LTPg, en las neuronas rostrales y caudales del GCS de la rata SHR y su contraparte normotensa la rata Wistar Kyoto (WKY) de 6, 8 y 12 semanas de edad. Encontramos que la LTPg no se expresó en las neuronas rostrales del GCS de la rata SHR de 12 semanas, pero si en las neuronas caudales y en las rostrales de las SHR de 6 y 8 semanas. El bloqueo GABAérgico con el antagonista de los receptores GABA-A, la bicuculina recupera la LTPg de la región rostral de la rata SHR de 12 semanas. En las ratas WKY, hay LTPg en ambas regiones a las 8 y 12 semanas, mientras que a las 6 semanas la LTPg se expresa en la región caudal, pero no en la rostral. La bicuculina restablece la LTPg de la región rostral de la rata WKY de 6 semanas. Se propone que; a) los ganglios simpáticos de la SHR modifican su plasticidad sináptica antes del inicio de la HTA; b) Los cambios neuroplásticos varían según la región intraganglionar explorada; c) el GABA endógeno modula la neuroplasticidad simpática; d) estos cambios en la neuroplasticidad que preceden a la HTA podrían ser parte de la hiperactividad simpática observada en esta enfermedad.

INTRODUCCIÓN

El sistema nervioso simpático

El sistema nervioso simpático (SNS) es parte del sistema nervioso autónomo (SNA), y está formado en su parte periférica eferente motora por las neuronas preganglionares localizadas en el asta intermedia lateral de los segmentos torácico 1 a lumbar 2 (T1-L2) de la médula espinal que liberan acetilcolina (ACh) como principal neurotransmisor. Estas neuronas preganglionares proyectan sus axones a través de las raíces ventrales y se comunican sinápticamente con las neuronas postganglionares localizadas en los ganglios simpáticos paravertebrales a ambos lados de la médula espinal, mismas que liberan noradrenalina y proyectan a su vez sus axones a los órganos blanco (Gibbins, 2012). La activación del SNS se manifiesta con respuestas globales de sus órganos blanco, como aumento de la frecuencia cardíaca, vasoconstricción, que resultan en aumentos de la presión arterial (Guyenet, 2006).

Ganglio cervical superior

El ganglio cervical superior (GCS) es un ganglio paravertebral que se localiza en la región dorsal del cuello en el origen de la arteria carótidea interna (Gibbins, 2012). Sus neuronas proyectan axones hacia los órganos localizados en la cabeza y cuello, que incluyen vasos sanguíneos, pupila, glándula lacrimal y glándula salival (Flett y Bell, 1991). Las neuronas dentro del GCS son de diferentes fenotipos y expresan un patrón de regionalización en la expresión tanto de sus receptores y sus neurotransmisores como de sus propiedades electrofisiológicas. Según su patrón de distribución regional las neuronas ganglionares se dividen en dos; las rostrales que proyectan sus axones por el nervio carotídeo interno (NCI), de fenotipo vasomotor, y las caudales que proyectan sus axones por el nervio carotídeo externo (NCE), de fenotipo secretomotor (Elinos et al., 2016).

Ácido gamma aminobutírico

El ácido gamma aminobutírico (GABA) es el neurotransmisor inhibitor más abundante del sistema nervioso; es un aminoácido sintetizado a partir del glutamato

por la enzima citoplasmática ácido glutámico descarboxilasa (GAD). En las terminales sinápticas, el GABA es almacenado en vesículas a través de una proteína transportadora (VGAT; Hell et al. 1988; Fykse y Fonnum, 1998). El GABA se libera en la sinapsis e interactúa con receptores específicos de dos tipos; los ionotrópicos, que son canales de cloro (Cl^-) activados por ligando y de acción rápida (GABA_A y GABA_C) y los metabotrópicos (GABA_B) acoplados a proteína G que actúan mediante segundos mensajeros afectando la conductancia del Calcio (Ca^{2+}) y del potasio (K^+) (Bowery y Enna, 2000). El GABA tiene un efecto inhibitorio sobre la transmisión ganglionar simpática (DeGroat, 1970; Bowery y Brown, 1974; Adams y Brown, 1975; González-Burgos et al, 1994; Elinos et al, 2016).

Receptores GABA_A sinápticos y extrasinápticos.

Los receptores de GABA_A son conjuntos pentaméricos compuestos de al menos tres proteínas diferentes con 19 subunidades que incluyen $\alpha 1-6$, $\beta 1-3$, $\gamma 1-3$, δ , ϵ , θ , π y $\rho 1-3$. Las propiedades farmacológicas están determinadas por las diferencias en la expresión de genes de las subunidades y su composición. La subunidad en el ensamblaje final también determina la localización sináptica o extrasináptica de los GABA_A dentro de una neurona. Los receptores extrasinápticos GABA_A que contienen subunidades $\alpha 6\beta\delta$ median una forma tónica de inhibición tanto in vitro como in vivo mientras que los receptores sinápticos GABA_A que contienen subunidades $\gamma 2$ están involucrados en la transmisión sináptica directa. (Stephen G. Brickley and Istvan Mody, 2012)

Hipertensión Arterial

La hipertensión arterial (HTA), según su origen puede ser primaria o esencial y secundaria. En este trabajo nos referiremos a la HTA esencial, trastorno que surge sin causa específica identificable y que se caracteriza por una elevación sostenida en la presión arterial \geq sistólica y/o 140 o \geq 90 diastólica, y constituye un factor de riesgo para la mortalidad y discapacidad. Estimaciones recientes indican que 874 millones de adultos en todo el mundo tienen una presión arterial sistólica (PAS) de 140 mmHg o más, esto se asocia con accidentes cerebrovasculares y

cardiovasculares, insuficiencia cardíaca y enfermedad renal crónica. En Los Estados Unidos de América es la segunda causa de muerte y se le considera una enfermedad prevenible. Dadas las tendencias demográficas y la creciente prevalencia de la HTA con el aumento de la edad, 79% en hombres y 85% en mujeres, se espera que las consecuencias de la HTA aumenten (J Am Coll Cardiol, 2017). En México en tan solo seis años, entre 2000 y 2006, la prevalencia de HTA incrementó 19.7% hasta afectar a 1 de cada 3 adultos (31.6%). Las complicaciones de la HTA se relacionan directamente con la magnitud del aumento de la tensión arterial y el tiempo de evolución. No hay duda de que, en general, el tratamiento temprano de la hipertensión arterial tiene importantes beneficios. Por esta razón la alta prevalencia de esta enfermedad en México adquiere mayor importancia si se considera que en 2006 47.8% de los adultos con hipertensión no había sido diagnosticado y únicamente 39.0% de los que ya habían sido diagnosticados recibía tratamiento.

Se ha observado un incremento de la actividad simpática en la hipertensión arterial (HTA) esencial con respecto a individuos normotensos. Estudios recientes en los que se han realizado medidas de la actividad simpática regional, han demostrado que existe un aumento de la actividad simpática a nivel del corazón, riñones y sistema vascular del músculo esquelético en individuos jóvenes menores de 45 años (Armario et al., 2001). Estos resultados han venido a confirmar hallazgos previos, por lo que se puede afirmar que el incremento del tono simpático puede estar ya presente en fases tempranas de la HTA (Armario et al., 2001). El incremento del tono simpático es un mecanismo que interviene tanto en el inicio como en el mantenimiento de la elevación de la presión arterial, así como en el desarrollo de algunas complicaciones, promoviendo el desarrollo de hipertrofia ventricular izquierda, arritmias o muerte súbita. Un incremento del tono simpático es también responsable de muchas de las alteraciones metabólicas como resistencia a la insulina o dislipidemia, así como de otras anomalías hemodinámicas y tróficas asociadas a la HTA esencial, involucradas en el incremento de la morbilidad y de la mortalidad cardiovascular asociada a la HTA (Armario et al., 2001)

El modelo de la rata espontáneamente hipertensa (SHR)

La cepa de ratas espontáneamente hipertensas o SHR por sus siglas en inglés (Spontaneously Hypertensive Rat), comenzó a generarse en el año de 1963, en la Universidad de Kyoto, por Okamoto y Aoki (Louis et al., 1990); quienes tras medir la presión sanguínea de una colonia de ratas Wistar (en las ratas Wistar es en promedio de 120/84 mm Hg), encontraron un macho con presión sistólica de entre 145-175 mm Hg y una hembra con presión de entre 130-140 mm Hg. Al cruzar estas ratas espontáneamente hipertensas, se obtuvo una descendencia que presentó incremento sostenido de la PA, con una meseta cerca de la sexta generación. Estas ratas presentaron lesiones típicas de la hipertensión esencial humana, Okamoto y Aoki (1963) pensaron que podrían ser un buen modelo para el estudio de esta patología y los animales fueron llamados ratas espontáneamente hipertensas (SHR). Finalmente, la cepa fue obtenida en octubre de 1969, después de varias generaciones de apareamientos entre hermanos seleccionados por haber presentado su presión sanguínea por encima de 150 mm Hg. Su control había sido mantenido por exogamia y la creencia de que una cepa endogámica de ratas normotensas serían un control más adecuado para las SHR, obligó al desarrollo de la cepa Wistar Kyoto (WKY), misma que se consiguió en 1971 en Japón. La rata SHR presenta muchas similitudes con la hipertensión esencial humana, lo que la hace un modelo adecuado para el estudio de la HTA, entre las características que comparte con la HTA esencial humana se encuentran: 1) la HTA parece ser de carácter poligénico; 2) los niveles plasmáticos de catecolaminas están elevados en plasma lo que sugiere que la hipertensión puede ser por alteraciones del eje simpáto-adrenal; 3) la presión sanguínea tiende a elevarse con la edad, en la rata SHR la HTA inicia a entre las 9 y 10 semanas, se establece a las 12 y se mantiene a partir de entonces (Rodríguez-Iturbe et al, 2005); 4) se observan las mismas complicaciones que en humanos, como la hipertrofia ventricular izquierda, dilatación y falla cardiaca congestiva, hemorragias cerebrales, nefroesclerosis con deterioro de la función renal; 5) Fármacos antihipertensivos de uso humano (reserpina, hidralazina, clorotiazida) han resultado ser útiles para el control de la presión

sanguínea en las SHR; 6) inicialmente no hay perturbaciones patológicas en las primeras etapas de vida en la que parámetros normales en todos los aspectos; excepto en la resistencia periférica total.

ANTECEDENTES

En el SNS, como en el sistema nervioso central (SNC), algunas formas de plasticidad sináptica pueden desempeñar un papel en el control de la función de los órganos inervados, ya que el incremento de la fuerza o la eficacia de la transmisión sináptica puede mejorar los impulsos tónicos a los órganos blanco, modificando sus funciones normales (Cifuentes et al., 2013). Uno de los tipos de plasticidad simpática más estudiado es la potenciación ganglionar a largo plazo (LTPg). Este fenómeno neuroplástico se caracteriza por un aumento duradero en la eficiencia de la transmisión sináptica inducida por un breve tren de impulsos de alta frecuencia (Alkadhi et al., 2005; Alonso deFlorida et al., 1991; Brown y McAfee, 1982; Cifuentes et al., 2013). En algunas condiciones patológicas, las neuronas preganglionares simpáticas, el componente presináptico de los ganglios simpáticos, aumentan su frecuencia de disparo en ráfagas de 5 Hz a 20 Hz (similar al patrón utilizado para inducir LTPg) (Preiss y Polosa, 1977). Alkadhi y Alzoubhi (2007) propusieron que, en la HTA, la presencia de LTPg in vivo refuerza la activación a los vasos sanguíneos, lo que resulta en un aumento de la resistencia periférica que eleva la presión arterial.

El aumento de la actividad nerviosa simpática se ha implicado en la fisiopatología de la HTA observada en modelos animales y pacientes hipertensos (Grassi, 2016; Grassi et al., 2011; Guyenet, 2006; Lundin y Thorén, 1982; Mancia et al., 1999; Palatini y Julio, 2009). Mediante el registro intracelular de neuronas posganglionares simpáticas de los ganglios cervicales superiores (GCS), Magee y Schofield (1994) encontraron que la estimulación preganglionar supramáxima provocó potenciales postsinápticos excitadores (EPSP) y corrientes postsinápticas excitatorias (EPSC) de mayor amplitud en las ratas SHR en comparación con las ratas WKy. También se ha descrito una menor adaptación de la frecuencia de disparo en las neuronas simpáticas de los ganglios de las ratas SHR (Yarowsky y Weinreich, 1985).

Se ha documentado que la hiperactividad simpática que subyace a HTA se puede detectar en etapas prehipertensivas (Cabassi et al., 1998; Li et al., 2012; Noll et al.,

1996; Simms et al., 2009). Por ejemplo, Li et al. (2012) encontraron que la despolarización inducía un aumento mayor en la concentración de calcio libre intracelular $[Ca^{2+}]_i$ en neuronas simpáticas cultivadas del GCS de ratas SHR neonatales (4-7 días) y ratas SHR prehipertensas (4-6 semanas) comparadas con ratas WKy normotensas de las mismas edades. Estos autores plantearon la hipótesis de que en las neuronas simpáticas posganglionares del GCS de las ratas SHR neonatales y prehipertensas la homeostasis del calcio estaba alterada, antes de desarrollar la HTA. Otra forma de hiperactividad simpática que ocurre en etapas prehipertensivas es el aumento de los niveles intersticiales de norepinefrina (NE), que se encontró en el tejido adiposo subcutáneo y del tejido muscular de la rata SHR prehipertensa de 4 a 5 semanas de edad (Cabassi et al., 1998). Simms y col. (2009) mostraron que la hiperactividad simpática medida como una amplificación relacionada con la frecuencia respiratoria contribuyó al aumento del tono vascular que resultó en HTA en rata SHR neonata y juvenil. En un estudio realizado en humanos, se demostró un aumento tanto en la actividad simpática como en los niveles plasmáticos de NE y endotelina provocados por la estimulación simpática (por ejemplo, estrés mental) en jóvenes de padres hipertensos, con lo que se sugirió que los antecedentes genéticos parecen determinar la regulación anormal de SNS que antecede el inicio de HTA (Noll et al., 1996).

Además de los cambios descritos en la hiperactividad simpática que ocurrieron tanto en las etapas prehipertensivas como hipertensivas de la rata SHR, también se han descrito modificaciones en la plasticidad sináptica en individuos hipertensos adultos. Adicionalmente a los hallazgos de una mayor amplitud en los EPSPs y EPSCs del GCS de la rata SHR, Magee y Schofield (1994) encontraron que los eventos sinápticos aumentaron menos durante la activación repetitiva de las neuronas posganglionares en la rata SHR en comparación con la rata WKy. También encontraron una facilitación disminuida a corto plazo en la rata SHR. Análogamente, el SNS de la rata SHR adulta mostró cambios en la plasticidad sináptica como falta de expresión de LTP en el SCG (Alzoubi et al, 2010). Queda entonces por dilucidar si pudieran detectarse cambios en la plasticidad sináptica en las ratas SHR

prehipertensas jóvenes. En este trabajo abordamos esta posibilidad caracterizando la expresión de LTPg en GCS de las ratas SHR prehipertensas de 6 semanas en comparación con la de ratas WKy de la misma edad. Con este enfoque, investigamos si los cambios tempranos en la neuroplasticidad, particularmente en la expresión de LTPg, pueden incluirse en la hiperactividad simpática que se ha propuesto como parte de los mecanismos que aumentan la presión arterial.

La población neuronal de GCS de la rata se puede agrupar en población rostral y caudal según su distribución regional. El GCS utiliza dos nervios eferentes para proyectar sus axones hacia objetivos específicos, las neuronas rostrales proyectan por el nervio carotídeo interno posganglionar (NCI), mientras que las neuronas caudales envían sus axones a través del nervio carotídeo externo (NCE) (Dail y Barton, 1983; Elinos et al., 2016; Flett y Bell, 1991). Las neuronas rostrales son en su mayoría inmunorreactivas al neuropéptido Y (NPY) (Elinos et al., 2016; Headley et al., 2005) y corresponden a neuronas vasomotoras, mientras que las neuronas caudales son de tipo secretomotoras y / o pilomotoras y mayoritariamente negativas para el NPY (Gibbins, 1991; Grkovic y Anderson, 1995; Headley et al., 2005; Li y Horn, 2006). Dadas estas características de vasomotoras o secretomotoras, se puede esperar que las neuronas rostrales y caudales estén diferencialmente involucradas en la regulación del tono de los vasos sanguíneos, con una mayor contribución de las neuronas rostrales. En consecuencia, en este trabajo, nos preguntamos si los cambios en LTPg de la rata SHR podrían ser diferentes en cada región del GCS.

Finalmente, caracterizamos si la regulación inhibitoria ejercida por GABA (de Groat, 1970; Ito et al., 2007; Wolff et al., 1986) sobre la transmisión ganglionar influye en la expresión de LTPg.

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Para determinar si los cambios plásticos del SNS también preceden a la aparición de la HTA, es de primera importancia investigar la expresión de la LTPg en diferentes etapas del desarrollo de la HTA en ratas SHR, particularmente en las pre-hipertensas. p. ej. de 6 semanas de edad. Considerando las diferencias regionales ganglionares resulta también relevante explorar si la expresión de la LTPg en las ratas SHR y WKy jóvenes y adultas muestra una dependencia regional. Finalmente, dado el efecto inhibitorio GABAérgico sobre la transmisión ganglionar, resulta importante explorar la participación de este transmisor inhibitorio en los cambios de la LTPg en las ratas SHR y WKy jóvenes y adultas.

HIPÓTESIS

Existen cambios plásticos, particularmente en la expresión de la LTPg que preceden la aparición de la HTA en las ratas SHR. Las ratas SHR pre-hipertensas de 6 semanas ya presentan cambios en la expresión de la LTPg. Existe una dependencia regional de la expresión de los cambios en la LTPg en las SHR. El GABA modula la expresión de la LTPg en las ratas SHR y WKy adultas y jóvenes respectivamente

OBJETIVOS

Caracterizar la transmisión basal y la plasticidad simpática, particularmente la expresión de la LTP en las regiones rostral y caudal de los GCS de las ratas SHR y WKy de 6, 8 y 12 semanas de edad. Determinar la participación del GABA en la expresión de la LTPg de las ratas SHR y WKy de 6, 8 y 12 semanas de edad.

MATERIALES Y MÉTODOS

Animales

Los experimentos se realizaron en ratas macho SHR y WKy de 6 semanas de edad (60-70gr.), 8 semanas de edad (180-210gr.) y 12 semanas de edad (210-230gr.) del animalario del Instituto de Fisiología Celular y ratas Wistar de (250-270 g) de 8 semanas de la Unidad de Modelos Biológicos del Instituto de Investigaciones Biomédicas de acuerdo a los lineamientos de la Guía Ética para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio de la Academia Nacional de Ciencias de los EUA y con la aprobación por nuestro Comité Institucional para el Cuidado y Uso de Animales de laboratorio (CICUAL). Se hizo todo lo posible para minimizar el estrés y número de animales utilizados.

Procedimiento Experimental

Las ratas se anestesiaron con ketamina (90 mg/kg, i.p.) y xilazina (10mg/kg, i.m.). El ganglio se extrajo rápidamente, cuidadosamente se les retiró la cubierta circundante de tejido conectivo y se seccionaron tanto el nervio preganglionar como los posganglionares con una longitud de 3-5 mm. Después, el ganglio fue transferido a una cámara de registro (Warner Instruments, Hamden, CT, USA) y perfundido con solución oxigenada (95% O₂, 5% CO₂) Ringer-Krebs (pH 7.4) con la siguiente composición en (mM): 136 NaCl, 4 KCl, 2 CaCl₂, 1 MgCl₂, 1 KH₂PO₄, 12 NaHCO₂, 11 glucosa y 2 μM de atropina. Todos los experimentos se hicieron con una temperatura controlada de 24.5°C ± 0.5 °C para facilitar la cuantificación de la LTPg.

Registros Electrofisiológicos

Para el registro y la estimulación, se utilizó el método descrito por Arias et al, 2014, donde el tronco simpático cervical preganglionar, el nervio carotídeo interno (NCI que transporta los axones de las neuronas rostrales) y el nervio carotídeo externo (NCE que transporta los axones de las neuronas caudales) fueron succionados al interior de electrodos de succión de vidrio. La estimulación se aplicó mediante un estimulador Pulsar 6i (FHC Inc., Bowdoin, ME, EE. UU.), y consistió en pulsos

cuadrados de voltaje supramáximos (9-12 V) de 0.1 ms de duración a 0.2 Hz. Se registraron los potenciales de acción compuestos (PAC) de los NCI y NCE. Los voltajes obtenidos se amplificaron ($\times 100$), mediante un amplificador diferencial (DP-301, Warner Instruments, Hamden, CT, EE. UU.) y digitalizados con una tableta de adquisición de datos multifunción (PCI-DAQ) con un convertidor AD de 16 bits utilizando un programa de adquisición personalizado escrito en LabView v8.6 (National Instruments, Austin, TX, EE. UU.). Se midieron las amplitudes basales de los PAC durante 3 a 4 horas para probar la estabilidad de las preparaciones. Las amplitudes de los PAC fueron constantes durante este período. Para determinar las diferencias en la transmisión basal entre los grupos, se realizó una curva de estímulo-respuesta. Para evitar la saturación de la población ganglionar que responde a los estímulos (Bachoo y Polosa, 1991), se bloqueó la transmisión ganglionar (nicotínica; 60-70%) con 100 μM de hexametonio o con 20 μM mecamilamina (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA) en animales jóvenes donde el hexametonio no produjo bloqueo. La LTP fue inducida con la aplicación de un tren de pulsos supramáximos a 40 Hz durante 3 segundos. El tren condicionante produjo un aumento inmediato en la amplitud de los PAC provocados por los pulsos de prueba. Las drogas se aplicaron a través de la solución de Krebs-Ringer directamente en la cámara de registro a las concentraciones indicadas, entre 15 y 40 minutos antes de la aplicación del tren de alta frecuencia, y se mantuvieron durante el experimento.

Agentes Farmacológicos

Los fármacos, bicuculina (2 μM), picrotoxina (60 μM) y gabazina (50 μM) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EE. UU.) se mantuvieron a - 20 °C hasta por 3 meses. Las soluciones experimentales se prepararon frescas en solución de Krebs-Ringer y se aplicaron directamente en la cámara de registro a las concentraciones finales indicadas. Cuando se usó DMSO como vehículo, su concentración final fue inferior al 0,5% y verificamos que no tuvo ningún efecto sobre la transmisión basal sináptica o LTPg.

Análisis de Datos

Para analizar la curva de estímulo-respuesta de cada grupo experimental, ajustamos la ecuación: $V_{min} / [1 + ((V_{max} / V_{min}) - 1) e^{-aV}]$, donde V_{min} es la respuesta mínima (ca. 0.003 mV), V_{max} es la respuesta máxima y a es el coeficiente de la pendiente de la curva (Banks, 1994). El valor del voltaje de entrada que produce la mitad de la respuesta máxima (V_{50}) se estimó por interpolación.

Expresamos nuestros datos utilizando la relación $\Delta R / R_0$, donde $\Delta R = R_i - R_0$, R_i es la amplitud del PAC en el tiempo $t = i$ y R_0 es el promedio de la amplitud de los PAC basales durante los 5 minutos antes de la estimulación de alta frecuencia. El curso temporal de la potenciación de las amplitudes de los PAC registradas en el NCI y NCE en respuesta a los pulsos del tren de alta frecuencia muestra una ecuación de decaimiento bi-exponencial (Brown y McAfee, 1982, Briggs y Brown, 1985, Cifuentes et al., 2004). Por lo tanto, ajustamos la función $f(t) = ae^{-t/\tau_1} + ce^{-t/\tau_2}$ a los datos de cada grupo experimental. El componente rápido (a y la constante de tiempo τ_1) corresponde a la potenciación post-tetánica (PTP), mientras que el componente lento (c y la constante de tiempo τ_2) corresponde a LTPg. Usando los parámetros del componente lento, cuantificamos la potenciación determinando el tiempo de decaimiento (LTP decay) de la LTPg como el tiempo en que el $\Delta R / R_0$ alcanza el 20% de potenciación sobre la amplitud de los PAC basales ($\Delta R / R_0 = 0.2$), y la extensión (LTP extent) del LTP (área bajo la curva desde $t = 0$ a $t =$ decaimiento de LTP). Para el cálculo de la extensión de LTP, restamos el área correspondiente al 20% de potenciación (Cifuentes et al., 2004).

Medida de la presión arterial

La presión arterial sistólica (PAS) se determinó mediante la técnica indirecta no invasiva para la arteria caudal de roedores con la ayuda de un pletismógrafo (LE 5002 Storage pressure meter, Panlab Harvard Apparatus; Boston, MA, USA).

Estadística

Los datos se expresan como media \pm ee. El nivel de significancia para las diferencias entre las medias se evaluó con una prueba t de Student independiente.

El nivel de significancia se estableció en $P < 0.05$.

RESULTADOS

Aumento de la presión arterial en la rata SHR de 12 semanas.

Para corroborar la etapa hipertensiva de los animales que se utilizaron se les midió de manera no invasiva la presión arterial en la arteria de la cola, a través de un pletismógrafo (tailcuff). Los resultados se muestran en la Figura 1, donde se puede observar que la rata SHR de 12 semanas es claramente hipertensa y sus valores de presión arterial son significativamente mayor que los otros grupos.

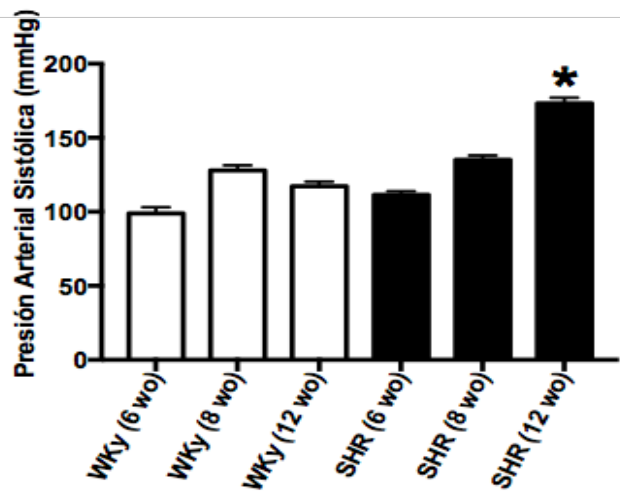


Figura 1: La rata SHR adulta de 12 semanas mostró una presión arterial sistólica significativamente más alta que la rata SHR de 6 y 8 semanas y que la rata WKy de 6, 8 y 12 semanas. La presión arterial sistólica (en mm Hg) fue de 111 ± 2 para la rata SHR de 6 semanas, 135 ± 3 para la rata SHR de 8 semanas, 173 ± 4 para la rata SHR de 12 semanas, 98 ± 4 para la rata WKy de 6 semanas, 128 ± 4 para la Wky de 8 semanas y 117 ± 3 para las WKy de 12 semanas. $P < 0.001$

Las neuronas rostrales del GCS de las SHR jóvenes prehipertensas expresaron la LTP evocada por el tren de alta frecuencia, mientras que los GCS de las ratas SHR adultas hipertensas no la expresaron.

En las neuronas rostrales del GCS de las ratas SHR prehipertensas de 6 semanas un tren de alta frecuencia evocó una robusta LTPg (LTP decay 284 ± 47 min y LTP extent de 72 ± 22 a.u.; Figura 2A, B). Por el contrario en las neuronas rostrales del GCS de la rata SHR hipertensa de 12 semanas no expresó LTPg, la magnitud de la

relación $\Delta R / R_0$ disminuyó rápidamente para alcanzar el valor basal (20% de la potenciación) en menos de 15 minutos después de la estimulación de alta frecuencia (LTP decay 10 ± 2 min y LTP extent 6 ± 1 a.u.), que fue significativamente menor que el GCS de la rata SHR prehipertensa de 6 semanas ($P=0.004$ para LTP decay y $P=0.006$ para LTP extent).

En las neuronas rostrales del GCS de ratas WKy encontramos un patrón de expresión de la LTPg opuesto al de los ganglios de las ratas SHR. Mientras que las neuronas rostrales del GCS de las ratas WKy de 12 semanas expresaron la LTP (LTP decay 85 ± 8 min y LTP extent 33 ± 3 a.u.), las del GCS de la rata Wky de 6 semanas expresaron una potenciación que no alcanzó las características de una LTPg control. La magnitud de la relación $\Delta R / R_0$ regresó al valor basal aproximadamente a los 40 minutos, LTP decay 42 ± 2 min y LTP extent 23 ± 1 a.u., que fueron significativamente menores que la LTPg de la rata WKy de 12 semanas ($P= 0.0002$ para LTP decay y $P= 0.039$ para LTP extent; Figura 2C, D).

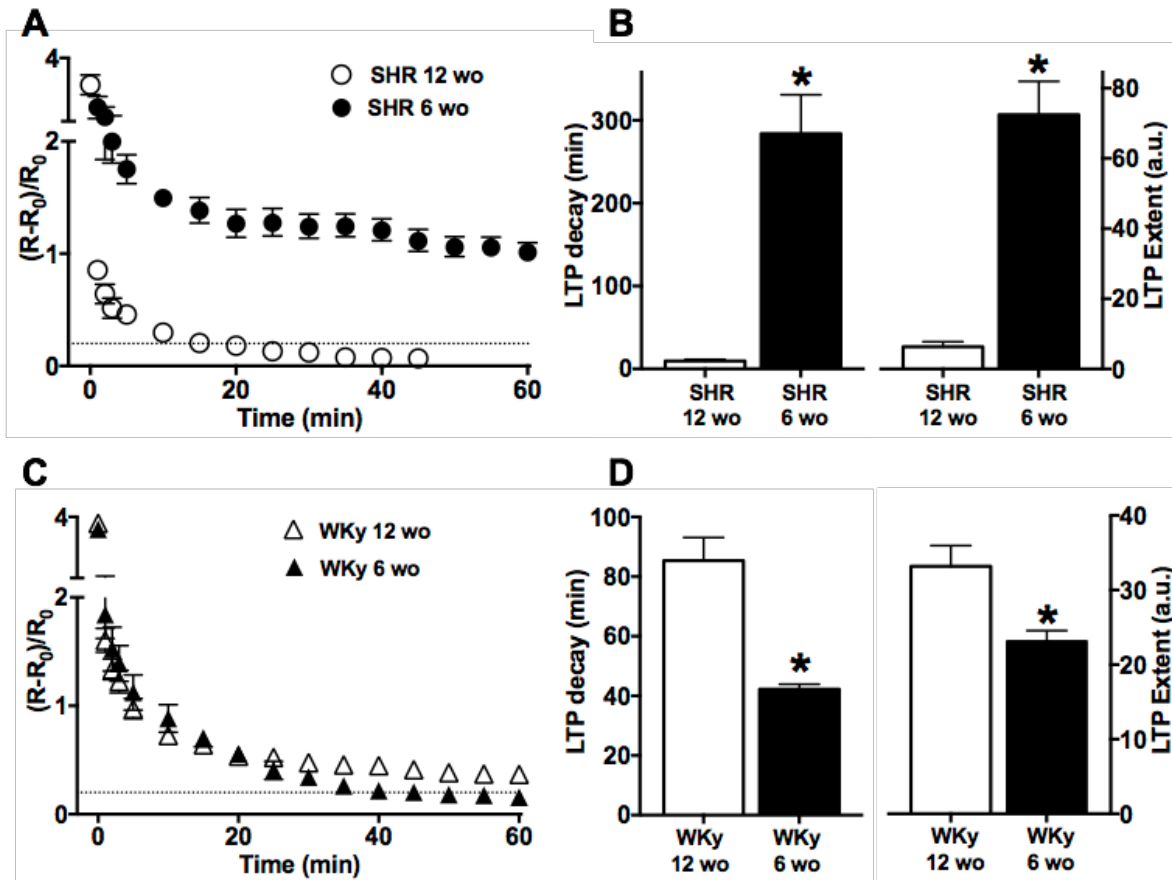


Figura 2: Las neuronas rostrales del GCS de la rata SHR de 6 semanas expresaron la LTP, mientras que las ratas SHR de 12 semanas no la expresaron. (A) Curso temporal de la potenciación sináptica expresada como $\Delta R / R_0$ (media \pm ee) registrada en ganglios aislados de la rata SHR joven, de 6 semanas (\bullet) y de la rata SHR hipertensa, adulta de 12 semanas (\circ). En los gráficos de barras se muestran los parámetros analizados, LTP decay 284 ± 47 min, LTP extent 72 ± 22 a.u. para ganglios de SHR de 6 semanas ($n=5$), vs LTP decay 10 ± 2 min, LTP extent 6 ± 1 a.u. de ganglios de la SHR de 12 semanas ($n=6$) ($P=0.004$ y $P=0.006$, respectivamente). (C) Curso temporal de la potenciación sináptica, $\Delta R / R_0$ (media \pm ee), registrado en las neuronas rostrales del GCS aislado de las ratas WKy de 6 (\blacktriangle) y 12 (\triangle) semanas de edad. (D) LTPg no se expresó (LTP decay 42 ± 2 min, LTP extent 23 ± 1 a.u.) a las 6 ($n=5$), pero si a las 12 semanas (LTP decay 85 ± 8 min, LTP extent 3 ± 3 a.u.;) $n=11$; $P=0.0002$ y $P=0.039$, respectivamente. Las líneas punteadas en (A) y (C) indican el valor basal de la LTPg (0.2).

Para determinar la hiperactividad simpática se caracterizó en las neuronas rostrales la transmisión basal del GCS de las ratas SHR y WKy de 6, 8 y 12 semanas respectivamente. Encontramos que los ganglios de la SHR de 12 semanas mostraron una respuesta mayor en comparación de los ganglios de las ratas WKy de la misma edad, $V_{max} 2.7 \pm 0.2mV$ vs $1.7 \pm 0.1 mV$ ($P < 0.0007$; figura 4C). El GCS de las ratas de 6 y 8 semanas no mostraron cambio en la transmisión basal en comparación con la rata WKy de las mismas edades (Figura 3A B). Finalmente, encontramos que la amplitud de los PAC fue menor en la rata SHR de 6 y 8 semanas que en la rata SHR de 12 semanas ($V_{max} 2.7 \pm 0.2mV$ para las SHR de 12 semanas vs $V_{max} 1.1 \pm 0.2mV$ para la rata SHR de 8 semanas y $V_{max} 1.0 \pm 0.1mV$ para la rata SHR de 6 semanas; $P < 0.001$ en ambas comparaciones).

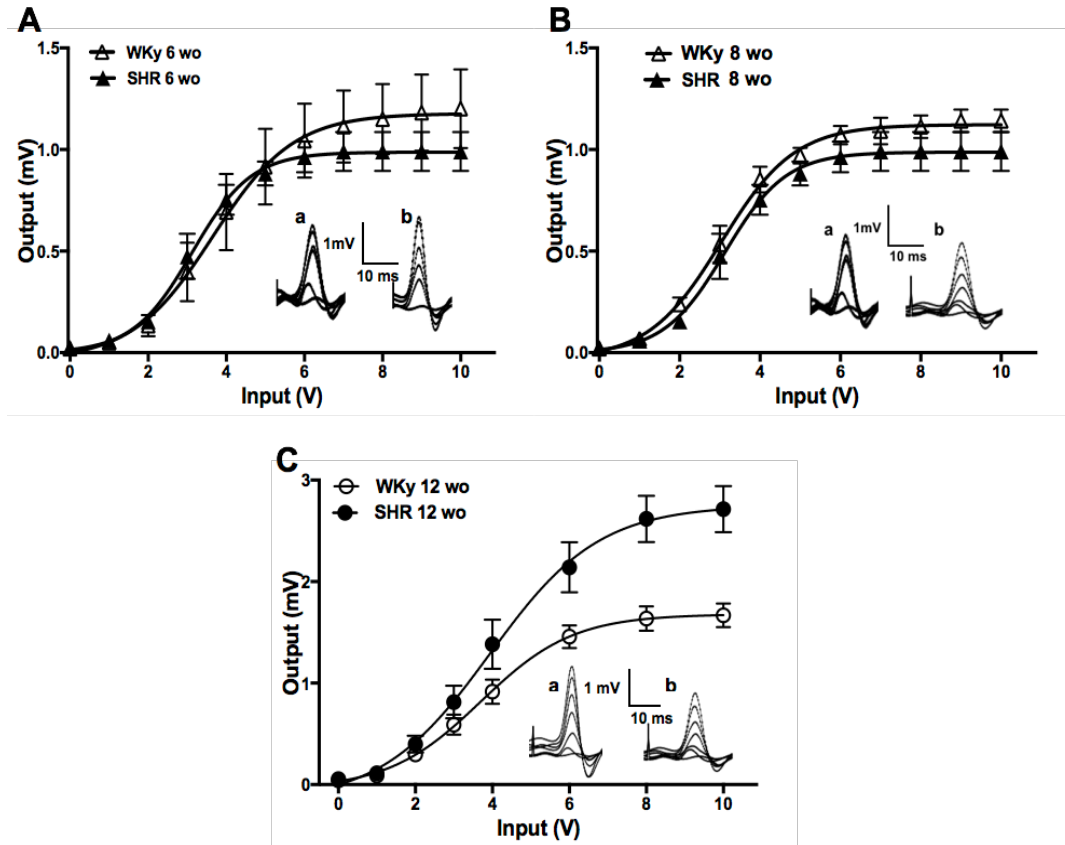


Figura 3: Los GCS de la rata SHR de 12 semanas mostraron una transmisión basal más eficiente que la de los GCS de las ratas WKy de la misma edad. En ratas de 6 y 8 semanas, de ambos grupos la transmisión fue similar. (A y B) Curva entrada/salida (I/O) de la transmisión ganglionar registrada en las neuronas rostrales del GCS (A y B) en rata SHR de 6 y 8 semanas (\blacktriangle ; $n=5$, \blacktriangle ; $n=6$, respectivamente) y WKy de las mismas edades (\triangle ; $n=5$, \triangle ; $n=5$, respectivamente), se observa que la transmisión ganglionar es similar en ambos grupos. (C) Curva entrada salida (I/O) de la transmisión ganglionar registrada en las neuronas rostrales de la rata SHR de 12 semanas (\bullet ; $n = 12$) y WKy de 12 semanas (\circ ; $n=12$), muestra que los estímulos de amplitud similar provocaron una mayor respuesta en las neuronas rostrales de los GCSs de las ratas SHR de 12 semanas que en las ratas WKy de la misma edad (V_{max} $2.7 \pm 0.2mV$ vs $1.7 \pm 0.1 mV$; SHR vs WKy; $P < 0.0007$). Se muestran trazos de los potenciales de acción compuestos (CAP) las ratas SHR (a) y WKy (b) obtenidas al incrementar la amplitud en la estimulación. Tomar en cuenta que las escalas de salida son diferentes

Los GCS de la SHR de 8 semanas expresaron LTP.

Considerando las diferencias observadas entre las ratas SHR jóvenes, de 6 semanas y adultas, de 12 semanas, exploramos la expresión de la LTPg en las ratas SHR con una edad intermedia, 8 semanas. Encontramos que los ganglios de la rata SHR y de la WKy de esta edad expresaron la LTP evocada por el tren de alta frecuencia. Obtuvimos un LTP decay 74 ± 11 min; LTP extent 28 ± 2 a.u. para la SHR de 8 semanas y LTP decay 90 ± 13 min; LTP extent 31 ± 2 a.u. para la WKy de la misma edad ($P > 0.05$ para ambos parámetros, LTP decay y LTP extent; Figura 4).

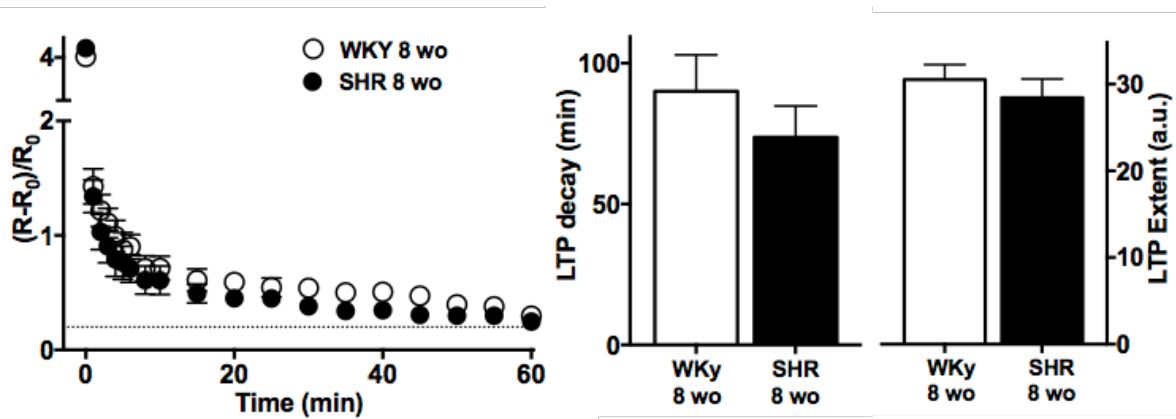


Figura 4: LTP de amplitud control se expresó en el GCS de las ratas SHR y WKy de 8 semanas. (A) Curso temporal de la potenciación sináptica, expresado como $\Delta R / R_0$ (media \pm ee, registrada en los ganglios aislados de la SHR (\bullet ; $n = 6$) y WKy (\circ $n = 6$) de 8 semanas de edad. (B) Gráficos de barras de los parámetros de la LTPg que muestran que la LTPg de los ganglios de ambos grupos expresan es de similar amplitud LTP decay 74 ± 11 min ; LTP extent 28 ± 2 a.u. para SHR y LTP decay 90 ± 13 min ; LTP extent 31 ± 2 a.u. para la rata WKy ($P > 0.05$ tanto para LTP decay como LTP extent). La línea puntada en (A) indica el basal de la LTPg (0.2).

La expresión de la LTPg mostró una regionalización en el GCS. Fue mayor en las neuronas caudales que en las rostrales de la rata Wistar.

En el GCS de la rata Wistar adulta, 8-9 semanas (equivalente por peso a las SHR y WKy de 12 semanas), como se esperaba, un tren supramáximo de 40 Hz por 3 segundos evocó una LTPg tanto en neuronas rostrales como caudales. Las neuronas ubicadas en la región caudal y registradas en el NCE, expresaron una mayor LTPg en comparación a las neuronas ubicadas en la región rostral registradas en el NCI. Encontramos que en las neuronas caudales el LTP decay fue de 376 ± 37 min y el LTP extent fue de 40 ± 2 a.u. mientras que en las neuronas rostrales fue de LTP decay 82 ± 8 min y el LTP extent fue de 30 ± 1 a.u. ($P < 0.006$ para ambos parámetros; Figura 5).

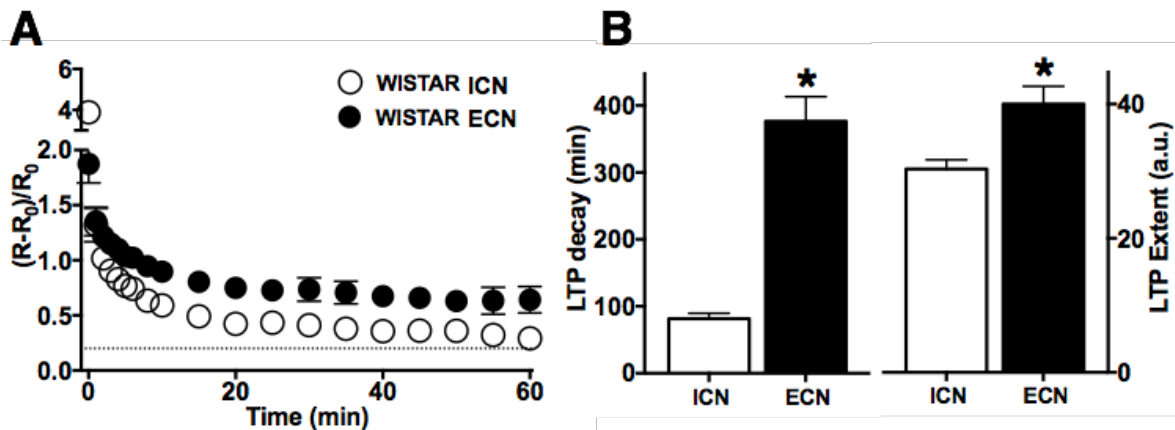


Figura 5: Los ganglios de las ratas Wistar mostraron una mayor LTP en las neuronas caudales en comparación con las neuronas rostrales. (A) Curso temporal de la potenciación sináptica evocada, expresado como $\Delta R / R_0$ (media \pm ee), en la región rostral, registrado en el nervio carotídeo interno (NCI, \circ) y en la región caudal, registrado en el (NCE, \bullet), de los ganglios aislados de la rata Wistar adulta de 8 semanas. (B) Gráficos de barras de los parámetros analizados de la LTPg; la LTPg expresada es mayor (LTP decay 376 ± 37 min y LTP extent 40 ± 22 a.u.) en el NCE (n=5) que la LTPg (LTP decay 82 ± 8 min y LTP extent 30 ± 1 a.u.) expresada en el NCI (n=6). ($P < 0.006$ para ambos parámetros). La línea punteada en (A) indica el valor basal de la LPTg (0.2).

También encontramos una dependencia regional de la sensibilidad farmacológica al antagonista nicotínico hexametonio. Este antagonista indujo menor bloqueo en las neuronas caudales, ($IC_{50} = 88 \pm 4 \mu M$), que en las rostrales ($IC_{50} = 37 \pm 4 \mu M$; $P < 0.0001$). La inhibición máxima también fue diferente entre regiones, $90 \pm 1\%$ para las neuronas caudales vs $96 \pm 2\%$ para las neuronas rostrales ($P < 0.02$; Figura 6)

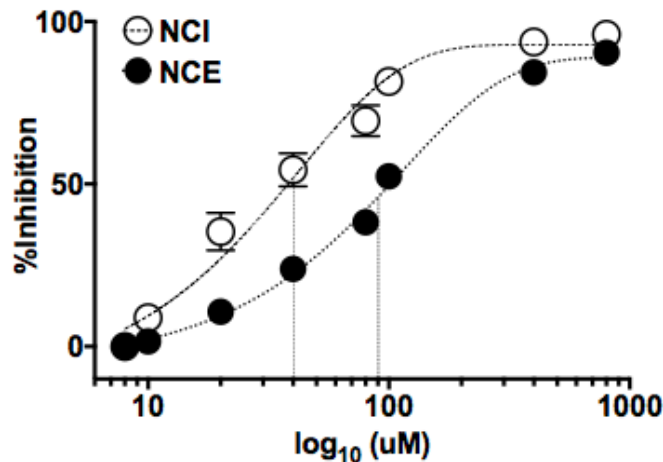


Figura 6: Las neuronas caudales fueron menos sensibles al antagonista nicotínico hexametonio. Curva dosis/respuesta de hexametonio registrada en el NCI (\circ) y en el NCE (\bullet) de los ganglios aislados de las ratas Wistar adultas de 8-9 semanas. Los registros (media \pm ee; $n=5$) muestran que el hexametonio produjo una mayor inhibición máxima en el NCI en comparación con el NCE ($96 \pm 2\%$ vs $90 \pm 1\%$; respectivamente; $P < 0.02$). Asimismo, la transmisión sináptica requirió mayor concentración de hexametonio en las neuronas caudales para alcanzar el valor IC_{50} ($88 \pm 4 \mu M$ para el NCE frente a $37 \pm 4 \mu M$ para las rostrales; $P < 0.0001$)

La LTP se expresó diferencialmente en las neuronas rostrales y caudales del GCS de las ratas adultas SHR y WKy.

Exploramos si existen diferencias regionales en la expresión de la LTPg en las ratas SHR hipertensas adultas, de 12 semanas y WKy de la misma edad. En la rata SHR de 12 semanas encontramos que la LTPg de las neuronas caudales se expresa, mientras que la LTPg de las neuronas rostrales no. El LTP decay fue de 331 ± 57 min y LTP extent 36 ± 4 a.u. en las neuronas caudales (Figura 7A, B). Por el contrario y como ya se refirió arriba, las neuronas rostrales no expresaron LTP (LTP

decay 13 ± 1 min y LTP extent 8 ± 1 a.u.; $P < 0.001$ para ambos parámetros; Figura 4A, B).

En contraste, el GCS de las ratas WKy de 12 semanas la LTPg se expresa en ambas regiones, siendo mayor en las neuronas caudales (LTP decay 379 ± 44 min y LTP extent 42 ± 1 a.u.) que en las neuronas rostrales (LTP decay 87 ± 5 min y LTP extent 34 ± 2 a.u.) ($P < 0.04$ para ambos parámetros; Figura 7C, D).

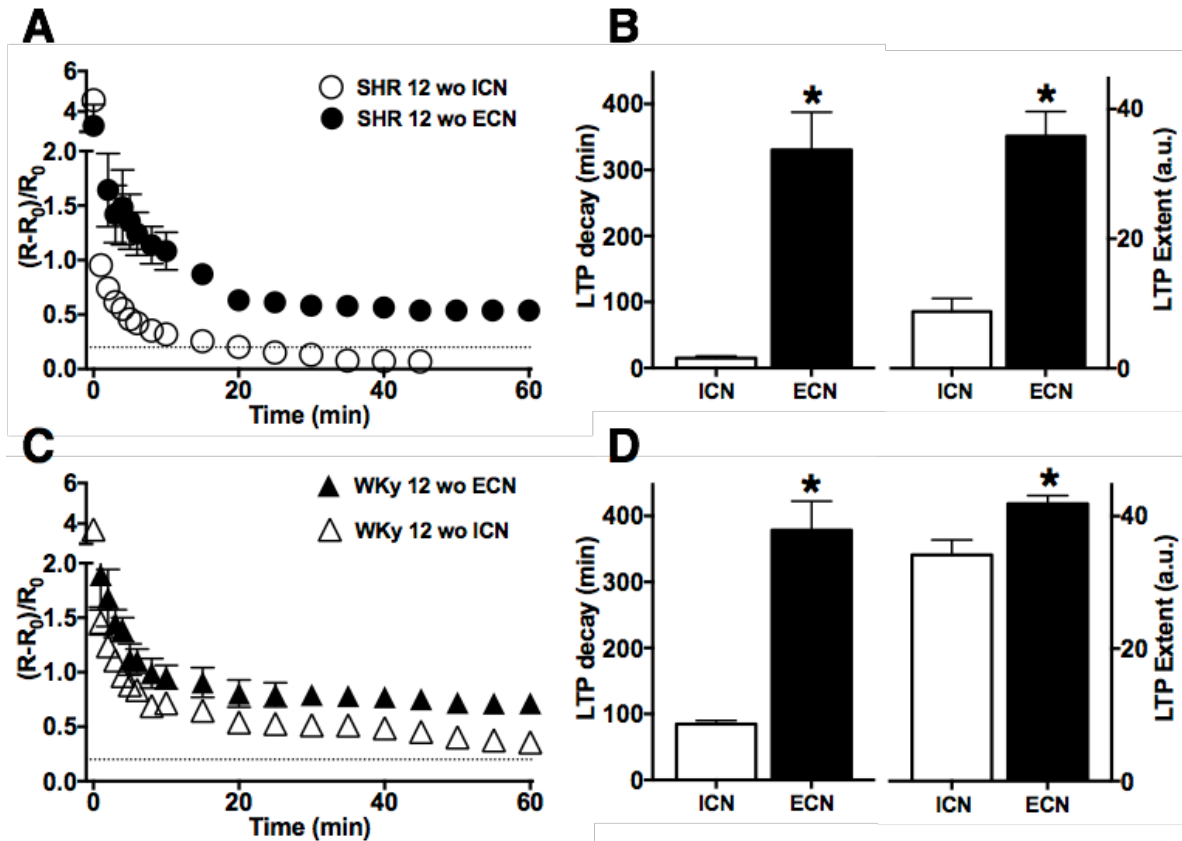


Figura 7. Los ganglios de la rata SHR de 12 semanas adultas, hipertensas expresan la LTPg en la región caudal pero no en la región rostral mientras que los ganglios de la rata WKy de la misma edad expresan la LTPg en ambas regiones, siendo mayor en la región caudal. (A) Curso temporal de la potenciación sináptica evocada, expresado como $\Delta R / R_0$ (media \pm ee), en la región rostral, registrado en el nervio carotídeo interno (NCI, \circ) y en la región caudal, registrado en el (NCE, \bullet), de los ganglios aislados de la rata SHR de 12 semanas. (B) Gráficos de barras de los parámetros analizados de la LTPg; la LTPg se expresa (LTP decay 331 ± 57 min y LTP extent 36 ± 4 a.u.) en el NCE (n=5) pero no se expresa (LTP decay 13 ± 1 min y LTP extent 8 ± 1 a.u.) en el NCI (n=7). ($P < 0.001$ para ambos parámetros). (C) Curso temporal de la potenciación sináptica evocada, expresado como $\Delta R / R_0$ (media \pm ee), en la región rostral, registrado en el nervio carotídeo interno (NCI, Δ) y en la región caudal, registrado en el (NCE, \blacktriangle), de los ganglios aislados de la rata WKy de 12 semanas. (B) Gráficos de barras de los parámetros analizados de la LTPg; la LTPg se expresa en ambos el NCE y NCI; la LTPg es mayor (LTP decay 379 ± 44 min y LTP extent 42 ± 1 a.u.) en NCE (n=5) que la LTPg (LTP decay 87.5 ± 5 min y LTP extent 34 ± 2 a.u.) expresada en el NCI (n=7). ($P < 0.03$ para ambos parámetros). Las líneas puntadas en (A) y (C) indican el valor basal de la LTPg (0.2).

La expresión de la LTPg mostró diferencias regionales en el GCS de las ratas SHR prehipertensas de 6 semanas y las ratas WKy de la misma edad.

Para determinar si las diferencias regionales en el GCS de las ratas SHR prehipertensas de 6 semanas y las ratas WKy de la misma edad también se encuentran presentes como en las ratas SHR hipertensas de 12 semanas, caracterizamos la expresión de la LTPg de las ratas SHR y WKy de 6 semanas.

Hallamos que también hay diferencias regionales en la expresión de la LTPg de las ratas SHR de 6 semanas, mientras que, como ya se mostró arriba, el tren de alta frecuencia evocó la LTPg en las neuronas rostrales ganglionares, no lo hizo en las caudales. El LTP decay fue de 254 ± 40 min y el LTP extent fue de 64 ± 11 a.u. en las neuronas rostrales (Figura 8A, B) en contraste con las neuronas caudales donde la relación $\Delta R / R_0$ disminuyó rápidamente después del tren de alta frecuencia, alcanzando el valor basal en menos de 15 minutos (LTP decay 10 ± 5 min y LTP ext 6 ± 3 a.u.; $P < 0.003$ para ambos parámetros; Figura 8A, B).

En las ratas WKy de 6 semanas, encontramos lo opuesto a las SHR de esta edad. Como ya se mencionó arriba, las neuronas rostrales expresaron una potenciación de corta duración (LTP decay 41 ± 2 min y LTP ext 22 ± 1 a.u). En contraste las neuronas caudales expresaron la LTP (LTP decay 218 ± 7 min y LTP ext 38 ± 2 a.u.; $P < 0.006$ para ambos parámetros; Figura 8C, D).

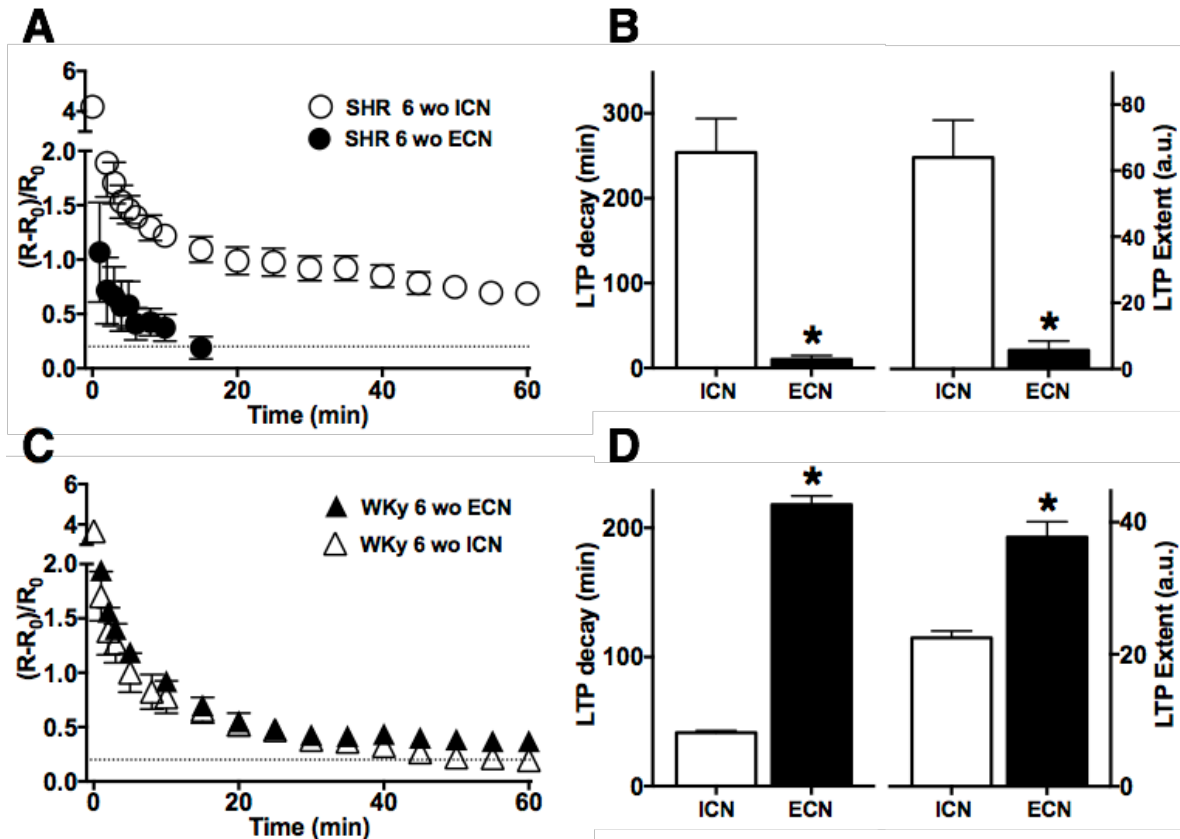


Figura 8: Los ganglios de las ratas SHR prehipertensas de 6 semanas expresan la LTPg en las neuronas rostrales, pero no en las caudales; mientras que los ganglios de las ratas WKy de 6 semanas expresan la LTPg en las neuronas caudales, pero no en las rostrales. (A) Curso temporal de la potenciación sináptica evocada, expresado como $\Delta R / R_0$ (media \pm ee), en la región rostral registrado en el NCI (\circ) y en la región caudal registrada en el NCE (\bullet) de los ganglios aislados de las ratas SHR de 6 semanas. (B) Gráfico de barras de los parámetros analizados, la LTPg se expresa (LTP decay 254 ± 40 min y LTP extent 64 ± 11 a.u.; $n=7$) en el NCI pero no en el NCE (LTP decay 10 ± 5 min y LTP extent 6 ± 3 a.u.; $n=5$; $P<0.003$ para ambos parámetros). (C) Curso temporal de la potenciación sináptica evocada, expresado como $\Delta R / R_0$ (media \pm ee), en la región rostral registrado en el NCI (Δ) y en la región caudal registrado en el NCE (\blacktriangle) de los ganglios aislados de las ratas WKy de 6 semanas. (D) Gráfico de barras de los parámetros, la LTPg se expresa (LTP decay 218 ± 7 min y LTP extent 38 ± 2 a.u.; $n=5$) en el NCE, pero no en el NCI (LTP decay 41 ± 2 min y LTP extent 22 ± 1 a.u.; $n=6$; $P<0.006$ para ambos parámetros). Las líneas punteadas en (A) y (C) indican el valor basal de la LTPg (0.2).

El bloqueo de los receptores del subtipo GABA_A en el GCS recupera la expresión de la LTP en las neuronas rostrales de la SHR hipertensa adulta.

Teniendo en cuenta el efecto inhibitorio de GABA endógeno en la LTPg encontrado en ratas Wistar (González-Burgos et al., 1997; Elinos et al., 2016), nos preguntamos si el GABA endógeno tiene un efecto inhibitorio similar sobre la LTPg evocada en las neuronas rostrales del GCS de la rata SHR de 12 semanas. Para investigar esta posibilidad, utilizamos bicuculina, un antagonista del receptor subtipo GABA_A y descubrimos que el bloqueo de la inhibición endógena de GABA desenmascaró la expresión de la LTPg evocada en las neuronas rostrales del GCS de la rata SHR adulta hipertensa (Figura 9A, B). En presencia de bicuculina los valores de la LTPg fueron LTP decay 94 ± 9 min y LTP ext 37 ± 2 a.u., significativamente mayor que los de las mismas neuronas del GCS de la rata SHR adulta hipertensa sin bicuculina; $P = 0.0002$ para LTP decay y $P = 0.004$ para LTP extent, respectivamente (Figura 9A, B).

Adicionalmente y considerando la corta duración de la potenciación expresada en las neuronas rostrales del GCS de la rata WKy de 6 semanas, probamos si el GABA endógeno también regula a la baja la LTPg en estas neuronas. Encontramos que la bicuculina en efecto recupera una robusta LTPg, 414 ± 103 min para LTP decay and 86 ± 11 a.u. para LTP extent en neuronas rostrales significativamente mayor que sin bicuculina, $P = 0.023$ para LTP decay y $P = 0.004$ para LTP extent respectivamente (Figura 9C D). Finalmente, también probamos si en el caso de la no expresión de LTPg en las neuronas caudales del GCS de la rata SHR de 6 semanas el GABA participa. Para ello intentamos recuperar la LTPg con diferentes antagonistas de los receptores GABA_A, como bicuculina ($2 \mu\text{M}$), picrotoxina ($60 \mu\text{M}$), y gabazine ($50 \mu\text{M}$). Ninguno de ellos pudo recuperar la LTP, lo que sugiere que un mecanismo diferente a la inhibición GABAérgica endógena es el responsable de la ausencia de la LTP en las neuronas caudales del GCS de la rata SHR de 6 semanas.

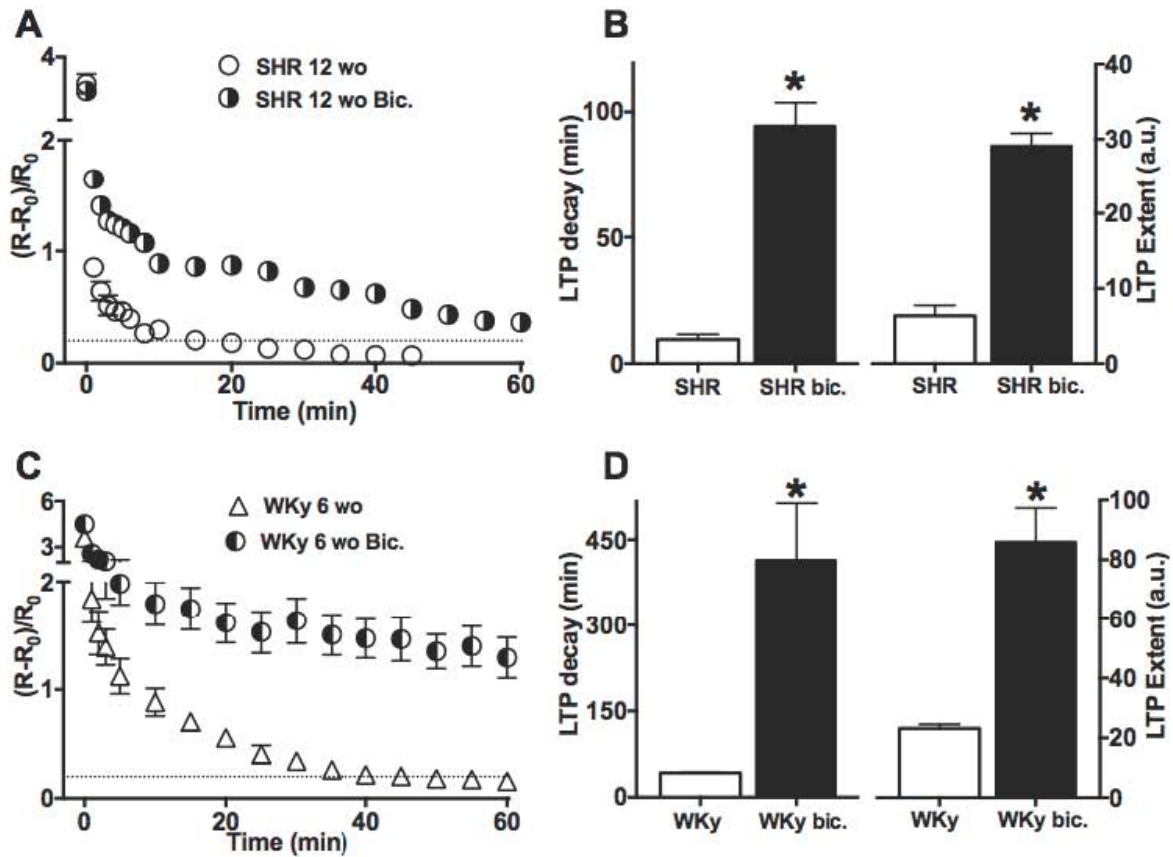


Figura 9: Los receptores del subtipo $GABA_A$ modulan la LTP en las neuronas rostrales del GCS de las ratas SHR hipertensas adultas y de las ratas WKy de 6 semanas. (A) Curso temporal de la potenciación sináptica evocada en las neuronas rostrales del GCS de la rata SHR de 12 semanas, expresado como $\Delta R / R_0$ (media \pm ee), en ausencia (\circ) y presencia de bicuculina $2 \mu M$ (círculos medio llenos). (B) Gráfico de barras de los parámetros analizados, la LTPg en las neuronas rostrales del GCS de la rata SHR de 12 semanas ($n=6$) fue recuperada al bloquear el receptor del subtipo $GABA_A$ (LTP decay 90 ± 9 min y LTP extent 37 ± 2 a.u.), mientras que sin bloqueo, no se expresa la LTPg ($n=6$; LTP decay 10 ± 1 min y LTP extent 6 ± 1 a.u.; $P=0.002$ y $P=0.004$, respectivamente). (C) Curso temporal de la potenciación sináptica evocada en las neuronas rostrales del GCS de la rata WKy de 6 semanas expresado como $\Delta R / R_0$ (media \pm ee), en ausencia de bicuculina (Δ) y en presencia de bicuculina (semicírculos completos) (B) Gráfico de barras de los parámetros analizados de la LTPg, el bloqueo del receptor del subtipo $GABA_A$ en las neuronas rostrales del GCS de la rata WKY de 6 semanas ($n=5$) recupera la expresión de la LTPg (LTP decay 414 ± 104 min y LTP extent 86 ± 11 a.u.), mientras que sin bloqueo, la LTPg no se alcanza a expresar (LTP decay 42 ± 2 min y LTP extent $2e \pm 1$ a.u.; $P=0.023$ y $P=0.004$, respectivamente). Las líneas punteadas en (A) y (C) indican el valor basal de la LTPg (0.2).

La expresión de la LTPg evocada con un tren de 10 Hz se comporta de manera similar que la LTPg evocada con 40 Hz.

Para probar si los cambios en la LTPg aquí descritos se pueden presentar también usando trenes condicionantes dentro del rango de disparo endógeno de 10 a 20 Hz descrito para las neuronas preganglionares simpáticas (Polosa, 1968; Stalbovskiy et al., 2014). Caracterizamos la LTPg evocado tras un tren de estímulo de 10Hz por 12 segundos. Encontramos que este tren de estímulos reprodujo en las ratas SHR y WKy, todas las características de la LTP encontradas previamente usando el tren de 40 Hz. La LTPg no se expresó en las neuronas rostrales del GCS de la rata SHR de 12 semanas (LTP decay 12 ± 3 min y LTP extent 8 ± 1 a.u.), pero si en las de SHR de 6 semanas (LTP decay 157 ± 17 min y LTP extent 46 ± 4 a.u.;). También se expresó la LTPg en las neuronas caudales del GCS de la rata SHR de 12 semanas (LTP decay 180 ± 53 min y LTP extent 36 ± 9 a.u.). En presencia de bicuculina en las neuronas rostrales del GCS de la rata SHR de 12 semanas se recuperó la expresión de la LTPg (LTP decay 170 ± 69 min y LTP extent 39 ± 6 a.u.).

Para las ratas WKy, las neuronas rostrales del GCS de la rata de 12 semanas si expresan la LTPg (LTP decay 98.7 ± 24 min y LTP extent 41 ± 7 a.u.), mientras que las de la rata de 6 semanas no (LTP decay 20 ± 5 min y LTP extent 11 ± 3 a.u.). La LTPg se expresó en las neuronas caudales del GCS de la rata WKy de 6 semanas (LTP decay 123 ± 10 min y LTP extent 31 ± 8 a.u.). La administración de bicuculina recuperó la LTPg en las neuronas rostrales de la GCS de la rata WKy de 6 semanas (LTP decay 145 ± 50 min y LTP extent 40 ± 8 a.u.; Figura 10).

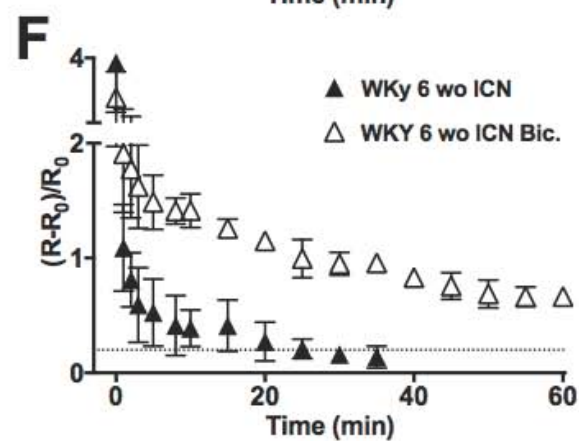
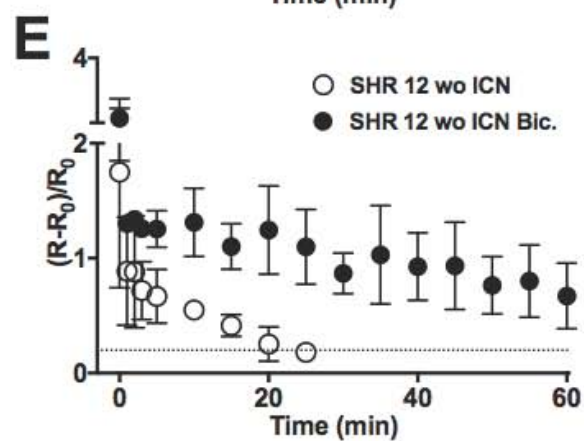
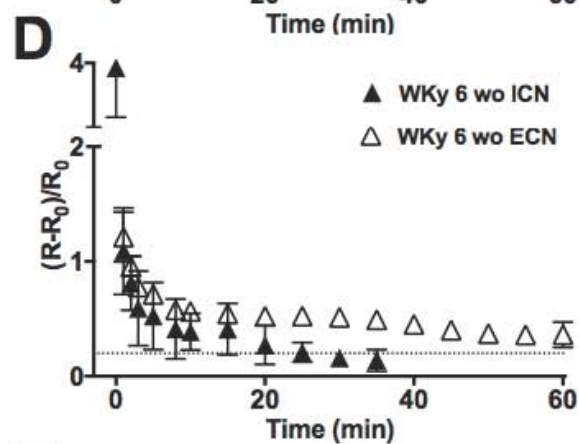
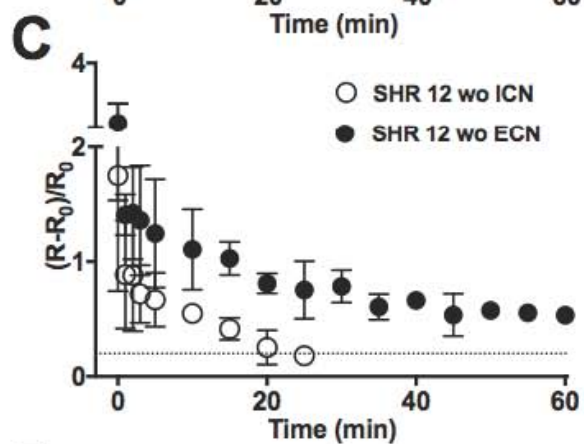
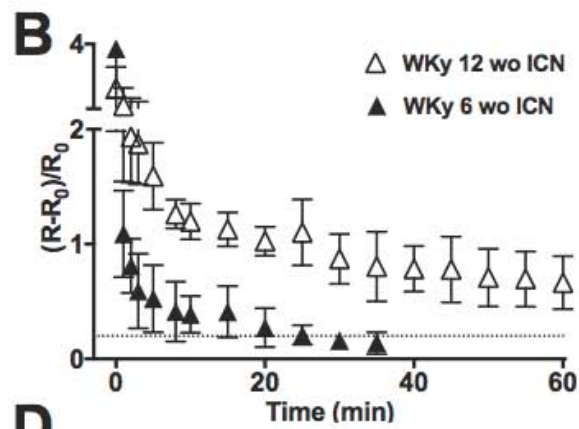
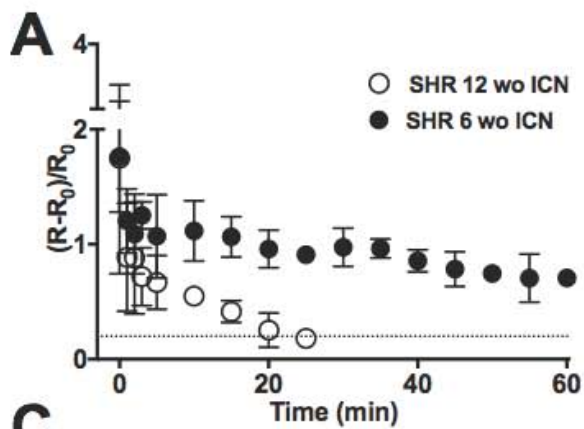


Figura 10. La LTPg evocada con un tren condicionante de 10 Hz se comporta de manera semejante a la evocada por un tren de 40 Hz. Se muestran los cursos temporales de la potenciación sináptica evocada, expresados como $\Delta R / R_0$ (media \pm ee), (A) Región rostral, registrada en el nervio carotídeo interno del GCS de rata SHR de 12 semanas (\circ) y de 6 semanas (\bullet). (B) Región rostral, del GCS de rata WKy de 12 semanas (Δ) y de 6 semanas (\blacktriangle) (C) Región rostral, (\circ) y caudal, registrada en el nervio carotideo externo (\bullet), del GCS de rata SHR de 12 semanas. (D) Región rostral (\blacktriangle) y caudal (Δ) de los GCS de rata WKy de 6 semanas (E) Región rostral del GCS de la rata SHR 12 semanas sin (\circ) y con bicuculina (\bullet). (F) Región rostral, del GCS de rata WKy de 6 semanas sin (\blacktriangle) y con bicuculina (Δ). Se puede observar que las neuronas rostrales del GCS de la rata SHR de 12 semanas no expresan la LTP pero si las de la rata SHR de 6 semanas. La LTPg se expresa también en las neuronas caudales de la SHR de 12 semanas y cuando se bloquea el receptor $GABA_A$ con bicuculina. Las neuronas rostrales del GCS de la rata WKy de 6 semanas no expresa la LTPg, mientras que en las de 12 semanas sí. La LTPg también se expresa en las neuronas caudales del GCS de la rata WKy de 6 semanas y cuando se bloquea el receptor $GABA_A$ con bicuculina en las neuronas rostrales del GCS de la rata WKy de 6 semanas.

Tabla1. Expresión de la LTPg en las diferentes condiciones experimentales estudiadas.

SHR Región	6 semanas		8 semanas		12 semanas	
	Rostral	Caudal	Rostral	Caudal	Rostral	Caudal
Sin bloqueo	++	-	+	+	-	+
Bloqueo GABA _A	NA	-	NA	NA	+	NA
WKy						
Sin bloqueo	-	+	+	+	+	++
Bloqueo GABA _A	++	NA	NA	NA	NA	NA
Wistar						
Sin bloqueo			+	++*		

GABA_A: Receptor GABAérgico subtipo A; +: presencia de LTPg de valores estándares; ++: LTPg de valores altos; NA: No aplicación de antagonista de GABA_A. * En la rata Wistar, las 8 semanas equivalen en peso a las ratas SHR y WKy de 12 semanas.

DISCUSIÓN

Los hallazgos presentados, resumidos en la Tabla 1, muestran que la neuroplasticidad del SNS, que subyace la expresión de la LTP en el GCS de las SHR cambia de acuerdo con la edad de la rata, la región ganglionar explorada y el nivel de la modulación inhibitoria GABAérgica. Así la LTPg se expresó en las neuronas rostrales del GCS de las SHR pre-hipertensas de 6 semanas de edad, pero no en las de la SHR hipertensa de 12 semanas. De manera llamativa, en las neuronas caudales ocurre lo contrario, la LTPg se expresa a las 12, pero no a las 6 semanas. La modulación GABAérgica media la ausencia de expresión de la LTPg en las neuronas rostrales de la SHR de 12 semanas, pero no la de las neuronas caudales de las SHR de 6 semanas. Nuestros resultados apoyan nuestra hipótesis de que los cambios neuroplásticos forman parte de la hiperactividad simpática que subyace la HTA.

En la rata control normotensa la WKy también encontramos variaciones en la expresión de la LTPg dependientes de la edad, región y nivel de modulación GABAérgica. En las ratas WKy de 12 semanas encontramos LTPg en ambas regiones exploradas, de mayor amplitud y duración en la región caudal. A las 6 semanas las ratas WKy expresan LTPg en la región caudal, pero no en la rostral. En esta región la inhibición GABAérgica restablece la expresión de la LTPg.

La primera observación de que la LTPg se expresó en las neuronas rostrales del GCS de la SHR prehipertensa de 6 semanas sugiere que la plasticidad sináptica del SNS precede al inicio de la HTA. En contraste las neuronas rostrales de los GCS de las ratas WKy de la misma edad de 6 semanas aún no desarrollan la capacidad de expresar la LTP. Estos cambios en la neuroplasticidad concuerdan con la hiperactividad simpática que ocurre antes del comienzo de la HTA (Li et al., 2012; Cabassi et al., 1998; Noll et al., 1996; Simms et al., 2009). Hasta ahora se habían descrito otros cambios en la plasticidad sináptica, como la reducción de la LTPg y la facilitación a corto plazo, en el GCS pero solo en las ratas SHR adultas hipertensas (Magee and Schofield, 1994; Alzoubi, et al., 2010). Hasta donde

sabemos, los resultados aquí reportados son la primera evidencia de que los cambios en la plasticidad sináptica del GCS de la SHR ocurren a edades tempranas, previo al comienzo de la HTA. Aunque hay controversia con respecto a la edad del inicio de la hipertensión en ratas SHR (Simms et al.; 2009, Dickhout and Lee, 1998), otros grupos de investigación y nosotros encontramos que las ratas SHR de 6 semanas son normotensas (Li et al., 2012; Li et al., 2006; Merino-Jiménez et al., 2018; Lee et al., 1991).

Nuestro estudio de la transmisión basal ganglionar en ratas SHR confirmó que esta aumenta en las adultas, según lo reportado por Magee y Schofield (1994). Por el contrario, en la rata SHR prehipertensa joven de 6 semanas, aunque hubo un aumento de la LTPg, la actividad ganglionar basal no aumenta. Sin embargo, hay algunos estudios que indican hiperactividad simpática a edades tempranas antes del inicio de la HTA (Cabassi, et al., 1998; Li, et al., 2012). Esta aparente contradicción puede deberse a que la transmisión basal ganglionar a diferencia de otros parámetros utilizados para evaluar la actividad simpática, no aumentó a las 6 semanas, pero probablemente aumente en edades mayores,

Como se esperaba, las neuronas rostrales de las ratas WKy adultas expresaron la LTPg, mientras que las de las ratas WKy de 6 semanas no la expresaron. Estos hallazgos sugieren que los mecanismos responsables de la LTPg en condiciones normales, como en las neuronas rostrales de las ratas WKy, requieren un proceso de maduración, el cual es más rápido en las ratas SHR en donde la LTPg sí se expresó a las 6 semanas de edad. En línea con esta idea, se sabe que la LTPg es un fenómeno dependiente de la edad (Alzoubi et al., 2010; Wu, 1991). Para explorar la posibilidad de que la LTPg se exprese a una edad intermedia, examinamos si los ganglios de la rata SHR de 8 semanas podían expresar la LTPg. Encontramos que a esta edad la LTPg se expresó en las ratas SHR, así como en las ratas WKy de la misma edad, este hallazgo apoya la idea de que la expresión de la LTPg, tanto en la rata SHR como en la WKy, depende de la madurez del animal.

En vista de que las neuronas ganglionares se distribuyen regionalmente en rostrales y caudales de acuerdo a sus características neuroquímicas, funcionales y a los órganos blancos inervados (Bowers and Zigmond, 1979; Bowers et al., 1984; Hendry et al., 1986; Flett and Bell, 1991; Luebke and Wright, 1992; Elinos et al., 2016), decidimos caracterizar las posibles diferencias intraganglionares (rostral vs caudal) en la expresión de la LTP en el GCS de las diferentes ratas estudiadas, Wistar de 8-9 semanas, SHR y WKy, de 6 y de 12 semanas. Encontramos que la LTPg se expresó diferencialmente de acuerdo con las neuronas exploradas. En las ratas SHR adultas de 12 semanas la LTPg se expresa en las neuronas caudales, pero no en las rostrales. En la rata WKy de 12 semanas, la LTPg se expresó en ambas regiones, siendo mayor en las neuronas caudales que en las rostrales. Por otro lado, en las ratas SHR jóvenes de 6 semanas la LTPg se expresó en las neuronas rostrales, pero no en las caudales. Finalmente, en las ratas WKy de 6 semanas la expresión de la LTPg fue en las neuronas caudales, pero no en las neuronas rostrales. Nuestros resultados muestran que la expresión de la LTPg se podría utilizar como un nuevo criterio de dependencia regional para clasificar las neuronas ganglionares. En un trabajo previo, reportamos que la transmisión ganglionar es más eficiente en las neuronas de la región caudal que en las neuronas de la región rostral (Elinos et al., 2016), la menor sensibilidad de las neuronas caudales al efecto antinicotínico del hexametonio apoya esta idea de que la transmisión basal en las neuronas caudales es más eficiente.

Dada la mayor presencia de GABA y de sus receptores del subtipo GABA_A en las neuronas rostrales que en las neuronas caudales del GCS de la rata Wistar (Elinos et al., 2016), es de esperarse que la mayor eficiencia de la transmisión ganglionar en las neuronas caudales sea el resultado de una menor inhibición de GABA en esta región. Esto podría correlacionarse con una funcionalidad diferencial de las neuronas rostrales y las neuronas caudales. Se ha reportado que las neuronas rostrales del GCS tienen principalmente una función vasomotora (Li and Horn, 2006) lo que implicaría tener un equilibrio preciso entre la inhibición y la excitación para regular adecuadamente el tono vasomotor. En contraste, las neuronas caudales del

GCS, son principalmente del tipo secretomotor (Gibbins, 1991; Grkovic and Anderson, 1997; Li and Horn, 2006) por lo que estas neuronas requerirían menos modulación inhibitoria en su regulación de secreción glandular. Esta menor inhibición GABAérgica de las neuronas caudales podría también ser el origen de un mayor número de neuronas de bajo umbral reportadas en esta región (Li and Horn, 2006). Esta reducción de umbral por menor inhibición GABAérgica explicaría una mayor activación de las neuronas caudales, tanto con estímulos de prueba individuales, o con tren de estímulo, que resultan en PAC y LTPg más grandes.

También encontramos que en las neuronas rostrales de los GCS de las SHR de 12 semanas y las caudales de las ratas WKy de 6 semanas la ausencia de la LTP se debió a la inhibición endógena GABAérgica, ya que al antagonizar la acción del GABA con bicuculina, antagonista del receptor subtipo GABA_A, se recuperó la LTPg. En apoyo a este papel modulador del GABA en la expresión de la LTPg, recientemente mostramos que hay mayor presencia en varicosidades simpáticas que contienen GABA en el GCS de la rata SHR de 12 semanas en comparación con la rata WKy de la misma edad (Merino-Jiménez et.al, 2018). Este efecto de GABA endógeno podría estar relacionado con el efecto antihipertensivo GABAérgico reportado en la rata SHR (Unger et al., 1984; Akine et al., 2003). Estos autores encontraron que la administración de GABA o el agonista de GABA_A muscimol en el ventrículo cerebral lateral o en el núcleo paraventricular hipotalámico disminuyó la presión arterial en la rata SHR haciéndola propensa a accidentes cerebrovasculares. Estamos ciertos de que la bicuculina, tiene otros efectos además del antagonismo del receptor GABA_A (Johnston, 2013), por ejemplo, también actúa en canales de potasio de pequeña conductancia activados por calcio, canales responsables de la post-hiperpolarización del GCS (McAfee and Yarowsky, 1979). Sin embargo este canal realiza una pequeña contribución al potencial de acción nicotínico ganglionar (Kawai and Watanabe, 1986), además de que se ha descrito la ausencia de esta conductancia en las neuronas del CGS de la rata SHR (Jubelin and Kannan, 1990), por lo tanto, es muy probable que la acción de la bicuculina que encontramos se limite al bloqueo del receptor subtipo GABA_A.

Los hallazgos del aumento en la presencia y de la función inhibitoria de GABA en el GCS de la rata SHR fueron inesperados, teniendo en cuenta que en el hipotálamo caudal (núcleo central simpático) el GABA disminuye —detectado genéticamente como una reducción en la expresión del gen que codifica para GAD— lo que resulta en hiperactividad simpática (Little et al., 2001). Una posible explicación de estos resultados es que los organismos aumentan la presencia de GABA en los ganglios simpáticos como un esfuerzo para contrarrestar la hiperactividad simpática característica de la HTA. El aumento en la transmisión basal fue acompañado por una reducción en la LTPg, estos resultados opuestos pueden explicarse si tenemos en cuenta los diferentes mecanismos celulares que intervienen en la LTPg y en la transmisión (la LTP es el resultado de un proceso complejo y multifactorial, mientras que la transmisión solo involucra liberación de neurotransmisor y activación del receptor). Se podría esperar entonces que el aumento de GABA afecte los mecanismos relacionados con la LTPg pero no los mecanismos responsable de la transmisión basal.

Un probable mecanismo que podría participar en la reducción de la LTPg, en las neuronas rostrales de las ratas SHR de 12 semanas, es el aumento del flujo de cloro (Cl^-), similar al encontrado en el músculo liso vascular de la rata SHR (Wang et al., 2004). En apoyo a esta hipótesis, Gonzales-Burgos et al., (1997) descubrió que la picrotoxina, un antagonista de los receptores de canales de Cl^- , antagoniza la inhibición GABAérgica, de la LTPg. Otro de nuestros resultados aparentemente contradictorio es que la LTPg se expresó en las neuronas rostrales de las SHR de 6 semanas, a pesar de mayor presencia de GABA (Merino-Jiménez et al., 2018). Esto puede explicarse por una mayor segregación de Acetilcolina (ACh) y GABA, detectada en la región caudal de los ganglios de las SHR de 6 semanas (Merino-Jiménez et al., 2018), que reduciría el efecto inhibitorio del GABA (Elinos et al., 2016). En contraste con las neuronas rostrales de los ganglios de las SHR, las de ganglios de ratas WKy de 12 semanas el GABA endógeno no enmascara la LTPg, pero si lo hace en las ratas Wky de 6 semanas sí. Es posible que en las ratas WKy,

la inhibición de GABA sobre la LTPg fuera alta en edades tempranas y la inhibición disminuyera a medida que las ratas WKy maduren. Se ha reportado que en algunas regiones del sistema nervioso central disminuye la regulación de GABA durante el desarrollo (Gutiérrez et al., 2003; Somogyi, 2003). En varios modelos animales, el aumento de la LTPg está asociada con el desarrollo o agravamiento de la HTA (Alkadhi et al. 2001; Gerges et al. 2002).

El aumento de la LTPg podría inducir y reforzar el tono simpático a los órganos diana, incluyendo los vasos sanguíneos, lo que resultaría en un aumento de la resistencia vascular periférica que conduciría a una elevación de la presión arterial (Alkadhi and Alzoubi, 2007). Alkadhi et al., (2001) propuso que el aumento de la LTPg endógena (por hiperactividad simpática) ocluye la LTPg evocada; sin embargo, nuestros datos (recuperación de la LTPg con el bloqueo del receptor subtipo GABA_A por bicuculina) sugieren que la inexpressión de la LTPg en ratas SHR de 12 semanas se debe a un aumento en la inhibición endógena de GABA. En otros modelos animales se ha propuesto que la LTPg contribuye alternativamente a los mecanismos de la HTA, por ejemplo, en el modelo de la rata dependiente de ouabaína y la rata hipertensa transgénica (mRen2) 27, se ha sugerido un papel para la angiotensina II. (Aileru et al., 2001; Aileru et al., 2004). Del mismo modo, en ratas control normotensas, la 5-HT puede desempeñar un papel tanto en la LTPg como en el control de la presión arterial (Alkadhi et al., 2005). Sin embargo, en estos estudios no se exploró la modulación GABAérgica.

CONCLUSIONES

La neuroplasticidad cambia en el SNS de la SHR joven antes de que inicie el incremento de la presión arterial. Estos cambios pudieran estar involucrados en el origen de la HTA.

La expresión temprana de la LTPg podría implicar un mayor flujo de actividad simpática lo que promovería un incremento de la resistencia vascular periférica, dando lugar al desarrollo de la HTA.

La detección temprana de los cambios en la LTP pudiera ser considerada como un marcador de susceptibilidad a desarrollar la HTA.

La LTPg muestra una dependencia regional en el GCS de ratas Wistar, WKy y SHR prehipertensas (6 semanas) e hipertensas (12 semanas). El gradiente rostrocaudal de la expresión de GABA y sus receptores tipo A, pudieran contribuir a la regionalización de la LTPg.

La regionalización de la LTPg puede servir como un nuevo criterio para clasificar diferentes subconjuntos de neuronas del GCS de la rata.

Las diferencias regionales en la expresión de la LTPg pueden correlacionarse con un nivel diferente de inervación de las neuronas rostrales y caudales sobre sus órganos blanco.

La inhibición GABAérgica endógena de la transmisión ganglionar aumenta en las neuronas rostrales de los GCS de la rata SHR de 12 semanas y de la WKy de 6 semanas.

Dada la hiperfunción simpática que subyace a la HTP, era de esperarse una reducción de la inhibición GABAérgica, el resultado inesperado de aumento

puede deberse a un intento del organismo de reducir la hiperfunción simpática ya establecida a las 12 semanas.

En las ratas control WKy la inhibición GABAérgica es alta y bloquea la expresión de la LTPg en edades tempranas (6 semanas) y se va reduciendo conforme la rata crece y alcanza las 8 y 12 semanas permitiendo la expresión de la LTP.

REFERENCIAS

- 1 "Committee on the care and use of Spontaneously hypertensive (SHR) Rats: Guidelines for Breeding, Care and Use", ILAR News, XIX: G3-G18,5, 1976
- 2 Aileru A A, De Albuquerque A, Hamlyn J M, Manunta P, Shah J R, Hamilton M J, and Weinreich D, "Synaptic plasticity in sympathetic ganglia from acquired and inherited forms of ouabain-dependent hypertension," *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 281, R635–R644, 2001.
- 3 Aileru A A, Logan E, Callahan M, Ferrario C M, Ganten D, and Diz D I, "Alterations in sympathetic ganglionic transmission in response to angiotensin II in (mRen2)27 transgenic rats," *Hypertension*, 43, 2, 270–275, 2004.
- 4 Akine A, Montanaro M, Allen A M, "Hypothalamic paraventricular nucleus inhibition decreases renal sympathetic nerve activity in hypertensive and normotensive rats," *Auton Neurosci*, 108(1-2), 17-21, 2003.
- 5 Alkadhi K A and Alzoubi K H, "Role of long-term potentiation of sympathetic ganglia (gLTP) in hypertension," *Clin Exp Hyperten*, 29, 267–286, 2007.
- 6 Alkadhi K A, Alzoubi K H, and Aleisa A M, "Plasticity of synaptic transmission in autonomic ganglia," *Prog Neurobiol*, 75, 83–108, 2005.
- 7 Alkadhi K A, Ootom S A, Tanner F L, Sockwell D and Hogan Y H, "Inhibition of ganglionic long-term potentiation decreases blood pressure in spontaneously hypertensive rats," *Exp Biol Med (Maywood)*, 226, 1024–1030, 2001.
- 8 Alkadhi K A, Salgado-Comissariat D, Hogan Y H, and Akpaudo S B, "Induction and maintenance of ganglionic long-term potentiation require activation of 5-hydroxytryptamine (5-HT₃) receptors," *J Physiol*, 496, 479-489, 1996.
- 9 Allen A M, "Inhibition of the hypothalamic paraventricular nucleus in spontaneously hypertensive rats dramatically reduces sympathetic vasomotor tone," *Hypertension*, 39(2), 275-280. 2002.
- 10 Alonso de Florida F, Morales M A, Minzoni A A, "long-term potentiation in the cat superior cervical ganglion in vivo". *Brain Res* 544, 203-210. *Brain*, 1991

- 11 Alonso-de Florida F, Morales M A, and Minzoni A A, "Modulated long-term potentiation in the cat superior cervical ganglion in vivo," *Brain Res*, 544, 203–210, 1991.
- 12 Alzoubi K H, Aleisa A M, and Alkadhi K A, "In vivo expression of ganglionic long-term potentiation in superior cervical ganglia from hypertensive aged rats," *Neurobiol Aging*, 31, 805–812, 2010.
- 13 Arias E R, Valle-Leija P, Morales M A, Cifuentes F, "Differential contribution of BDNF and NGF to long-term potentiation in the superior cervical ganglion of the Rat", *Neuropharmacology*, 81, 206-214, 2014.
- 14 Armario P, Hernández del Rey R y Almendros Ribas M C, "Papel del sistema nervioso simpático en la etiopatogenia de la hipertensión arterial", *ELSEVIER*, vol. 18, 7, pp. 327-335, 2001
- 15 Bachoo M and Polosa C, "Long-term potentiation of nicotinic transmission by a hetero-synaptic mechanism in the stellate ganglion of the cat," *J Neurophysiol*, 65, 639–647, 1991.
- 16 Banks R B, "Growth and Diffusion Phenomena: Mathematical Frameworks and Applications," Springer-Verlag, Berlin, 1994.
- 17 Bowery N G and Brown D A, "γ-Aminobutyrylcholine: actions on GABA and acetylcholine receptors," *J Pharm and Pharmacol*, 24, 663–666, 1972.
- 18 Briggs C A, Brown T H, and McAfee D A, "Neurophysiology and pharmacology of long-term potentiation in the rat sympathetic ganglion," *J Physiol*, 359, pp. 503–521, 1985.
- 19 Brown T H and McAfee D A, "Long-term synaptic potentiation in the superior cervical ganglion," *Science*, vol. 215, 1411–1413, 1982.
- 20 Cabassi A, Vinci A, Calzolari M, Bruschi G, and Borghetti A, "Regional sympathetic activity in pre-hypertensive phase of spontaneously hypertensive rats," *Life Sciences*, 62, 1111–1118, 1998.
- 21 Cifuentes F, Arias E R, and Morales M A, "Long-term potentiation in mammalian autonomic ganglia: an inclusive proposal of a calcium-dependent, trans-synaptic process," *Brain Res Bull*, 97, 32–38, 2013.

- 22 Cifuentes F, Licona I I, De León L, Medina P, De-Miguel F F, and Morales M A, "Contribution of different calcium channels to long-term potentiation in superior cervical ganglion of the rat," *Neuroscience*, 129, 647–653, 2004.
- 23 de Groat W C, "The actions of gamma-aminobutyric acid and related amino acids on mammalian autonomic ganglia," *J Pharmacol Exp Ther*, 172, 384–396, 1970.
- 24 Dickhout J G and Lee R M, "Blood pressure and heart rate development in young spontaneously hypertensive rats," *Am J Physiol*, 274, H794–H800, 1998.
- 25 Dobó E, Kása P, Wenthold R J, Joó F, and Wolff J R, "Evidence for GABAergic fibers entering the superior cervical ganglion of rat from the preganglionic nerve trunk," *Histochemistry*, 92, 133–136, 1989.
- 26 Elinos D, Rodríguez R, Martínez L A, Zetina M E, Cifuentes F, and Morales M A, "Segregation of acetylcholine and GABA in the rat superior cervical ganglia: functional correlation," *Front Cell Neurosci*, 10, 91, 2016.
- 27 Esler M, Ferrier C, Lambert G, Eisenhofer G, Cox H and Jennings G, "Biochemical evidence of sympathetic hyperactivity in human hypertension," *Hypertension*, 17 (4 Suppl), III, 29–35, 1991.
- 28 Esler M, Lambert G and Jennings G, "Regional norepinephrine turnover in human hypertension," *Clin Exp Hyperten*, A11, suppl. 1, 75–89, 1989.
- 29 Gerges N Z, Aleisa A M, Alhaider A A and Alkadhi K A, "Reduction of elevated arterial blood pressure in obese Zucker rats by inhibition of ganglionic long-term potentiation," *Neuropharmacology*. 43, 1070–1076, 2002
- 30 González-Burgos G R, Biali F I, and Cardinali D P, "Picrotoxin-sensitive receptors mediate gamma-aminobutyric acid-induced modulation of synaptic plasticity in rat superior cervical ganglion," *Brain Research*, 751, 148-151, 1997.
- 31 González-Burgos G R, Biali F I, Nicola Siri L C, and Cardinali D P, "Effect of gamma-aminobutyric acid on synaptic transmission and long-term potentiation in rat superior cervical ganglion," *Brain-Research*, vol. 658:, no, 1–2, pp. 1–7. 1994.

- 32 Grassi G, "Sympathomodulatory effects of antihypertensive drug treatment," *American J Hyperten*, 29, 665–675, 2016.
- 33 Gutiérrez R, Romo-Parra H, Maqueda J, Vivar C, Ramírez M, Morales M A, and Lamas M, "Plasticity of the GABAergic phenotype of the "glutamatergic" granule cells of the rat dentate gyrus," *J Neurosci*, 23, 594–5598, 2003.
- 34 Guyenet P G, "The sympathetic control of blood pressure," *Nature Rev Neurosci*, 7, 335–346, 2006.
- 35 Hogan Y H, Hawkins R and Alkadhi K A, "Adenosine A1 receptor activation inhibits LTP in sympathetic ganglia," *Brain Res*, 807, 19–28, 1998.
- 36 Ito T, Hioki H, Nakamura K, Tanaka Y, Nakade H, Kaneko T, Iino S and Nojyo Y, "Gamma-aminobutyric acid-containing sympathetic preganglionic neurons in rat thoracic spinal cord send their axons to the superior cervical ganglion," *J Comp Neurol*, 502, 113–125, 2007.
- 37 *J Am Coll Cardiol*, "Guideline for the Prevention, Detection, Evaluation, and Management of High Blood Pressure in Adults". Sep. 2017, 23976; DOI 10.1016/j.jacc.2017.07.745, 2017.
- 38 Johnston G A, "Advantages of an antagonist: bicuculline and other GABA antagonists," *British Journal of Pharmacology*, 169, 328–336, 2013.
- 39 Joó F, Siklós L, Dames W, Wolff J R, "Fine-structural changes of synapses in the superior cervical ganglion of adult rats after long-term administration of GABA. A morphometric analysis" *Cell Tissue Res*, 249(2), 267-75, 1987.
- 40 Jubelin B C, Kannan M S, "Neurons from neonatal hypertensive rats exhibit abnormal membrane properties in vitro," *Am J Physiol*, 259 (Cell Physiol 28), C389- C396, 1990.
- 41 Kawai T and Watanabe M, "Blockade of Ca-activated K conductance by apamin in rat sympathetic neurons," *Br J Pharmac*, 87, 225-232, 1986.
- 42 Khawaled R, Bruening-Wright A, Adelman J P and Maylie J, "Bicuculline Block of Small-conductance Calcium-activated Potassium Channels," *Pflügers Archiv, European Journal of Physiology*, 438(3), 314-321, 1999.
- 43 Lee M R K W, Borkowski K L , Frans H H , Leenen J, Tsoporis J and Coughlin M, "Combined effect of neonatal sympathectomy and adrenal demedullation

- on blood pressure and vascular changes in spontaneously hypertensive rats”,
Circulation research, 1991
- 44 Lee R M, Borkowski K R, Leenen F H, Tsoporis J and Coughlin M, “Combined effect of neonatal sympathectomy and adrenal demedullation on blood pressure and vascular changes in spontaneously hypertensive rats,” Circulation Research, 69, 714–721, 1991.
- 45 Li D P and Pan H L, “Plasticity of GABAergic control of hypothalamic presympathetic neurons in hypertension” Am J Physiol Heart Circ Physiol, 290, H1110-1119, 2006.
- 46 Li D, Lee C W, Buckler K, Parekh A, Herring N, and Paterson D J, “Abnormal intracellular calcium homeostasis in sympathetic neurons from young prehypertensive rats,” Hypertension, 59, 642–649, 2012.
- 47 Little H R, Kramer J M, Beatty J A, Waldrop T G, “Chronic exercise increases GAD gene expression in the caudal hypothalamus of spontaneously hypertensive rats,” Brain Res Mol Brain Res, 95, 48-54. 2001.
- 48 Livingston R B, “Visceral Control Mechanisms” in Best and Taylor’s Physiological Basis of Medical Practice, (12th ed.), J.B. West (Ed) pp 1053–1067, Baltimore: Williams and Wilkins, 1990.
- 49 Louis W J and Howes L G, “Genealogy of the Spontaneously Hypertensive Rat and Wistar Kyoto Rat Strain: Implications for Studies of Inherited Hypertension” Journal of Cardiovascular Pharmacology, 16 (7); S2-S3, 1990
- 50 Magee J C and Schofield G G, “Alterations of synaptic transmission in sympathetic ganglia of spontaneously hypertensive rats,” Am J Physiol, 267, pp. R1397–R1407, 1994.
- 51 Magnaghi V, Ballabio M, Consoli A, Lambert J J, Roglio I and Melcangi R C, “GABA receptor-mediated effects in the peripheral nervous system: A cross-interaction with neuroactive steroids”, J Mol Neurosci, 28(1), 89-102, 2006.
- 52 McAffe D A and Yarowsky, “Calcium-dependent potentials in the mammalian sympathetic neurone,” J Physiol, 290, 507-523, 1979.
- 53 Merino-Jiménez C, Miguel F, Feria-Pliego J A, Zetina-Rosales M E, Cifuentes F and Morales M A, “Sympathetic Hyperactivity and Age Affect Segregation

- and Expression of Neurotransmitters,” *Front Cell Neurosci*, 12, 411, 2018.
- 54 Noll G, Wenzel R R, Schneider M, Oesch V, Binggeli C, Shaw S, Weidmann P, and Luscher T F, “Increased activation of sympathetic nervous system and endothelin by mental stress in normotensive offspring of hypertensive parents,” *Circulation*, 93, 866–869, 1996.
- 55 Okamoto K and Aoki K, “Development of a strain of spontaneously hypertensive rats”, *Jpn Circ J* 27:282-93, 1963
- 56 Polosa C, “Spontaneous activity of sympathetic preganglionic neurons”, *Canadian J Physiol Pharmacol*, 46, 887–896, 1968.
- 57 Rivera C C, Hernández G R, Marín S H, “Manejo reproductivo de las colonia de Rata Espontáneamente Hipertensa (SHR) y su control Normotenso Wistar Kyoto (WKY) en el bioterio del Instituto de Fisiología Celular de la Universidad Nacional Autónoma de México”, *REDVET*, vol. 14, núm. 11B, pp. 1-22, 2013
- 58 Rodríguez-Iturbe B, Ferrebuz A, Vanegas V, Quiroz Y, Mezzano S, Vaziri N D, “ Early and sustained inhibition of nuclear factor-kappaB prevents hypertension in spontaneously spontaneously rats”, *J Pharmacol Exp Ther*, 315(1),51-7, 2005.
- 59 Segura-Chama P, Hernández A, Jiménez-Pérez N, Alejandre-García T, Rivera-Cerecedo C V, Hernández-Guijo J and Hernández-Cruz A, “Comparison of Ca²⁺ currents of chromaffin cells from normotensive Wistar Kyoto and spontaneously hypertensive rats,” *Cell Mol Neurobiol*, 30, 12431–250, 2010.
- 60 Segura-Chama P, López-Bistrain P, Pérez-Armendáriz E M, Jiménez-Pérez N, Millán-Aldaco D and Hernández-Cruz A, “Enhanced Ca (2+)-induced Ca(2+) release from intracellular stores contributes to catecholamine hypersecretion in adrenal chromaffin cells from spontaneously hypertensive rats,” *Pflügers Archiv* 467, 2307–2323, 2015.
- 61 Simms A E, Paton J F, Pickering A E, and Allen A M, “Amplified respiratory-sympathetic coupling in the spontaneously hypertensive rat: does it contribute to hypertension?,” *J Physiology*, 587(3), 597–610, 2009.

- 62 Somogyi J, "Functional significance of co-localization of GABA and Glu in nerve terminals: a hypothesis," *Curr Top Med Chem*, 6, 969–973, 2006.
- 63 Southam E, Charles S L, and Garthwaite J, "The nitric oxide-cyclic GMP pathway and synaptic plasticity in the rat superior cervical ganglion," *Br J Pharmacol* 119, 527–532, 1996.
- 64 Stalbovskiy A O, Briant L J, Paton J F, and Pickering A E, "Mapping the cellular electrophysiology of rat sympathetic preganglionic neurones to their roles in cardiorespiratory reflex integration: a whole cell recording study in situ", *J Physiol*, 592, 2215–2236, 2014.
- 65 Stephen G. Brickley and Istvan Mody, "Extrasynaptic GABAA receptors: Their function in the CNS and implications for disease", *Neuron*, 73(1), 23-34, 2012.
- 66 Unger T, Becker H, Dietz R, Ganten D, Lang R E, Rettig R, Schömig A, and Schwab N A, "Antihypertensive effect of the GABA receptor agonist muscimol in spontaneously hypertensive rats. Role of the sympathoadrenal axis," *Circulation Res*, 54, 30-37, 1984.
- 67 Vargas R, Cifuentes F and Morales M A, "Differential contribution of extracellular and intracellular calcium sources to basal transmission and long-term potentiation in the sympathetic ganglion of the rat," *Developmental Neurobiology*, 67, 589–602, 2007.
- 68 Vargas R, Cifuentes F and Morales M A, "Role of presynaptic and postsynaptic IP3 – dependent intracellular calcium release in long-term potentiation in sympathetic ganglion of the rat," *Synapse*, 65, 441–448, 2011.
- 69 Wang Z, Chai Q, Liu Z, Liu D and Chen L, "Chloride channel activity of vascular smooth muscle in the spontaneous hypertensive rats," *Chinese Journal of Physiology*, 47,129-135, 2004
- 70 Wolff J R, Joó F, Kása P, Storm-Mathiesen J, Toldi J and Balcar V J, "Presence of neurons with GABA-like immunoreactivity in the superior cervical ganglion of the rat," *Neuroscience Letters*, 71, 157–162, 1986.
- 71 Wolff J R, Kása P, Dobó E, Wenthold R J, and Joo F, "Quantitative analysis of the number and distribution of neurons richly innervated by GABA-immunoreactive axons in the rat superior cervical ganglion," *J Comp Neurol*,

282, 264–273, 1989.

- 72 Wu R L, McKenna D G and McAfee D A, “Age-related changes in the synaptic plasticity of rat superior cervical ganglia,” *Brain Research*, 542, 324–329, 1991.
- 73 Yarowsky P and Weinreich D, “Loss of accommodation in sympathetic neurons from spontaneously hypertensive rats,” *Hypertension*, 7, 268–276, 1985.

ANEXOS

Artículo publicado 13/10/2019

Ganglionic Long-Term Potentiation in Prehypertensive and Hypertensive Stages of Spontaneously Hypertensive Rats Depends on GABA Modulation

Artículo en proceso de publicación

Long-term potentiation is differentially expressed in rostral and caudal neurons in the superior cervical ganglion of normal and hypertensive rats.

Research Article

Ganglionic Long-Term Potentiation in Prehypertensive and Hypertensive Stages of Spontaneously Hypertensive Rats Depends on GABA Modulation

Luis A. Martínez, Fredy Cifuentes, and Miguel A. Morales 

Departamento de Biología Celular & Fisiología, Instituto de Investigaciones Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México, Ciudad de México, Mexico

Correspondence should be addressed to Miguel A. Morales; mamm@biomedicas.unam.mx

Guest Editor: Ahmmed Ally

Copyright © 2019 Luis A. Martínez et al. This is an open access article distributed under the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

The sympathetic nervous system (SNS) regulates body functions in normal and pathological conditions and is characterized by the presence of a neuroplastic phenomenon, termed ganglionic long-term potentiation (gLTP). In hypertension, either in spontaneously hypertensive rats (SHR) or in humans, sympathetic hyperfunction, such as elevated SNS outflow and changes in synaptic plasticity have been described. Because enhanced SNS outflow is detected in the hypertensive stage and, more importantly, in the prehypertensive phase of SHR, here we explored whether synaptic plasticity, particularly gLTP, was modified in the superior cervical ganglia (SCG) of prehypertensive SHR. Furthermore, considering that GABA modulates sympathetic synaptic transmission and gLTP in Wistar rats, we studied whether GABA might modulate gLTP expression in SHR. We characterized gLTP in the SCG of young prehypertensive 6-week-old (wo) and adult hypertensive (12 wo) SHR and in the SCG of Wistar Kyoto (WKy) normotensive control rats of the same ages. We found that gLTP was expressed in 6 wo SHR, but not in 12 wo rats. By contrast, in WKy, gLTP was expressed in 12 wo, but not in 6 wo rats. We also found that gLTP depends on GABA modulation, as blockade of GABA-A subtype receptors with its antagonist bicuculline unmasked gLTP expression in adult SHR and young WKy. We propose that (1) activity-dependent changes in synaptic efficacy are altered not only during hypertension but also before its onset and (2) GABA may play a modulatory role in the changes in synaptic plasticity in SHR, because the blockade of GABA-A receptors unmasked the expression of gLTP. These early changes in neuroplasticity and GABA modulation of gLTP could be part of the sympathetic hyperfunction observed in hypertension.

1. Introduction

The sympathetic nervous system (SNS) is involved in the regulation of many functions—including blood pressure, cardiac contractility, intestinal motility, and some exocrine gland secretions—under normal [1] and in pathological conditions, such as hypertension [2]. In the SNS, there are some forms of synaptic plasticity that could play a role in controlling the function of innervated organs; thus, they could modify normal functions by enhancing tonic efferent impulses to targets [3]. One of the phenomena of synaptic plasticity present in the SNS is ganglionic long-term potentiation (gLTP), which was described long ago, and is characterized by a long-lasting enhancement in the efficacy of ganglionic

transmission induced by a brief high-frequency train of presynaptic impulses [4–6]. The underlying mechanisms are not completely understood. gLTP is a Ca^{2+} -dependent phenomenon resulting from the participation of several intracellular signaling pathways [5, 7–12] and may play a role in the modulation of peripheral autonomic nervous system activity, including the regulation of blood vessel tone. The sustained presence of gLTP *in vivo* would reinforce neural outflow to blood vessels, resulting in an increase of peripheral resistance that elevates blood pressure [13].

Hypertension, the chronic elevation of arterial blood pressure, is a major human health problem. Most neurogenic forms of hypertension originate from and are sustained by an increase in sympathetic-adrenal tone [2]. Heightened

sympathetic nerve activity has been implicated in the pathophysiology of hypertension observed in animal models and hypertensive patients [14–20]. For example, a loss of spike accommodation and an exaggerated calcium conductance in sympathetic ganglionic neurons from spontaneously hypertensive rats (SHR) compared with that in ganglia of Wistar Kyoto (WKy) normotensive rats has been described [14]. An increase in norepinephrine (NE) turnover in the central nervous system may be the basis of the enhanced sympathetic outflow in hypertensive humans [15, 16]. Magee and Schofield [17] found a larger amplitude of fast excitatory postsynaptic potentials (EPSPs) and currents (EPSCs) in SHR than those in WKy. In addition to the evidence for sympathetic overdrive occurring in hypertension, changes in the neuroplasticity of the SNS have been reported. Magee and Schofield [17] found diminished short-term facilitation in SHR, whereas Alzoubi et al. found that LTP is not expressed in sympathetic ganglia of adult hypertensive SHR [21].

Heightened sympathetic nerve activity can be detected before the development of hypertension both in animal models and in humans [22–25]. For example, an increase in interstitial levels of NE has been found in prehypertensive SHR [23]. Simms et al. [24] reported enhanced respiratory-related bursts of sympathetic activity in neonate and young prehypertensive SHR, while Li et al. [25] found a rise in the depolarization-dependent intracellular free calcium concentration ($[Ca^{2+}]_i$) and faster decay of $[Ca^{2+}]_i$ transients in sympathetic neurons from prehypertensive SHR. In normotensive children of hypertensive parents, sympathetic stimulation triggers a greater increase in plasma levels of NE and endothelin and a greater enhancement of muscle sympathetic nerve activity than it does in normal children whose parents are not hypertensive [22]. Considering these findings, we hypothesized that neuroplastic changes might also occur at earlier ages in SHR. In the present work, we addressed this issue, by characterizing the expression of LTP in the superior cervical ganglia (SCG) of prehypertensive 6-week-old (wo) SHR.

The main classical transmitter of the ganglionic synapse in the SCG is acetylcholine (ACh), which can be colocalized with other classical transmitters, such as GABA [26–30]. The modulatory effect of GABA on ganglionic cholinergic transmission has been described previously [30–33]. GABA acting on GABA-A and GABA-B receptors inhibits ganglionic transmission, and acting on GABA-A receptors also obstructs the occurrence of LTP in the rat SCG [33, 34]. There are other reports on the role of GABA in central and peripheral neural plasticity: Li and Pan [35] showed a neural plasticity of GABA receptor function in neurons of the paraventricular nucleus of SHR. Magnaghi et al. [36] demonstrated that GABA acting on GABA-A and GABA-B receptors controls Schwann-cell proliferation and expression of some specific myelin proteins in sciatic nerve. Likewise, structural changes of synapses in the SCG adult rats after long-term administration of GABA have been reported [37]. We confirmed the contribution of endogenous GABA in the expression of gLTP [30], and reported recently that GABA expression is greater in the SCG of SHR than in WKy [38]. According to the evidence that (i) heightened

sympathetic nerve activity can be detected before the development of hypertension in SHR [22–25], (ii) GABA can block the occurrence of LTP in rat SCG of Wistar rats [33, 34], (iii) GABA presence can increase in SCG of SHR [38], and (iv) GABA has an antihypertensive central effect in SHR [39–41], we draw the following hypothesis: “early changes in neuroplasticity, particularly in the expression of gLTP, and its modulation by GABAergic inputs would be part of the mechanisms underlying neurogenic hypertension in SHR”.

In the present study, we explored neuroplastic changes in response to train-evoked gLTP before the onset of and during hypertension. We also characterized the modulatory effects of endogenous GABA in the neuroplastic changes occurring in hypertension.

2. Materials and Methods

2.1. Animals. Seed stocks of SHR and WKy rats were purchased from Charles River (Boston MA, USA) and then reproduced and bred in the animal house facilities of the Instituto de Fisiología Celular, UNAM. We used 6wo (90–110 g), 8wo (180–210 g), and 12wo (240–270 g) male rats in accordance with the Ethical Guidelines for the Care and Use of Laboratory Animals from the National Academy of Sciences of the United States. The project was approved by the Committee for the Care and Use of Laboratory Animals (CICUAL) of our institute. All efforts were made to minimize the number of animals used, as well as their stress.

2.2. Experimental Procedures. Rats were anaesthetized with ketamine (90 mg/kg, i.p.) and xylazine hydrochloride (10 mg/kg, i.p.). The SCG was exposed, rapidly excised, and carefully desheathed. Then, the preganglionic and postganglionic nerve roots were trimmed to a length of 3–5 mm. Next, the ganglia were transferred to a recording chamber (Warner Instruments, Hamden, CT, USA) and perfused with oxygenated (95% O₂, 5% CO₂) Krebs-Ringer solution (pH 7.4) containing (in mM) 136 NaCl, 4 KCl, 2 CaCl₂, 1 MgCl₂, 1 KH₂PO₄, 12 NaHCO₃, 11 glucose, and 2 μM atropine. All experiments were conducted at a controlled temperature of 24.0 ± 0.5°C to facilitate quantification of gLTP (duration 60–90 min).

For recording and stimulation, we followed a previously described procedure [42]. The preganglionic cervical sympathetic trunk and the internal carotid nerve were pulled into bipolar suction electrodes. Stimuli were applied by a Pulsar 6i Stimulator (FHC, Bowdoin, ME, USA) consisting of supramaximal square voltage test pulses (9–12 V) of 0.1 ms duration at 0.2 Hz. Compound action potentials (CAPs) were recorded from the postganglionic nerve. Voltage traces were amplified (×100), bandpass filtered by a differential amplifier (DP-301; Warner Instruments, Hamden, CT, USA), and digitized with a multifunction data-acquisition board (PCI-DAQ) with a 16-bit A-D converter using a custom-made acquisition program written in LabVIEW (version 8.6; National Instruments, Austin, TX, USA). We measured basal CAP amplitudes over 3 to 4 h to test the stability of the recordings. CAP amplitudes were constant during this

period. Differences in baseline transmission between groups were assessed using an input/output (*I/O*) curve. To minimize CAP signal saturation, approximately 50%–60% of nicotinic receptors were blocked by the addition of 100 μ M of hexamethonium (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) [43]. LTP was induced by a train of supramaximal pulses applied at 40 Hz for 3 s, unless otherwise indicated. The conditioning train produced an immediate increase in the amplitude of postsynaptic CAPs evoked by test pulses. Drugs were applied via Krebs-Ringer solution directly into the recording chamber at the indicated concentrations, between 15 and 40 min before the application of the high-frequency stimulus train, and were maintained during the experiment. All experiments were performed by interleaving the experimental animals with controls to reduce random differences in other factors, distinct from age and strain.

2.3. Pharmacological Agents. Stock solution of bicuculline (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) was prepared in dimethyl sulfoxide (DMSO) and stored at -20°C for up to 3 months. Dilutions for experiments were freshly prepared in Krebs-Ringer solution and directly applied into the recording chamber at the indicated final concentrations. The final concentration of DMSO was less than 0.5%, and we verified that this concentration had no effect on synaptic transmission or gLTP.

2.4. Data Analysis. To analyze the *I/O* curve, we fitted the equation $V_{\min}/[1 + ((V_{\max}/V_{\min}) - 1)e^{-aV}]$ to data points, where V_{\min} is the minimum response (ca. 0.003 mV), V_{\max} is the maximum response, and a is the slope coefficient of the curve [44]. The input voltage value that produces half the maximum response (V_{50}) was estimated by interpolation.

We expressed our data using the relation $\Delta R/R_0$, where $\Delta R = R_i - R_0$, R_i is the CAP amplitude at time $t = i$, and R_0 is the average of the basal CAP amplitude during the 5 min before high-frequency stimulation. The time course of CAP amplitudes recorded in the internal carotid nerve in response to train pulses shows a biexponential decay [4, 5, 10]. Therefore, we fitted the function $f(t) = ae^{-t/\tau_1} + ce^{-t/\tau_2}$ to the data of each experiment. The rapid component (α and time constant τ_1) corresponds to posttetanic potentiation (PTP), while the slow component (c and time constant τ_2) corresponds to gLTP. Using the slow component parameters, we assessed potentiation determining LTP decay as the time in which the $\Delta R/R_0$ reaches 20% of potentiation over the amplitude of basal CAPs ($\Delta R/R_0 = 0.2$), and LTP extent (area under the curve from $t = 0$ to $t = \text{LTP decay}$). For the calculation of LTP extent, we subtracted the area corresponding to the 20% of potentiation [10].

2.5. Statistics. Data are expressed as mean \pm SEM. The significance level for differences between the means was evaluated with an independent Student *t*-test. The significance level was set at $P < 0.05$.

3. Results

The systolic arterial blood pressure was measured before experiments with an indirect tail-cuff apparatus. Six wo

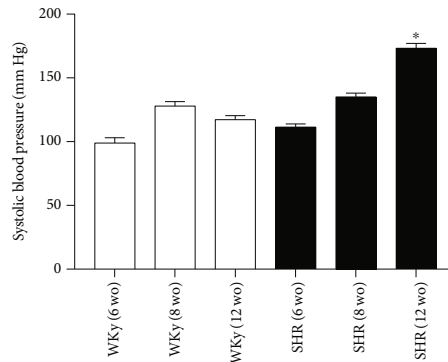


FIGURE 1: Adult 12 wo SHR showed significant higher blood pressure than 6 and 8 wo SHR and 6, 8, and 12 wo WKy. Systolic blood pressure was (in mm Hg) 111 \pm 2 for 6 wo SHR, 135 \pm 3 for 8 wo SHR, and 173 \pm 4 for 12 wo SHR; for WKy, systolic blood pressure was 98 \pm 4 for 6 wo rats, 128 \pm 4 for 8 wo rats, and 117 \pm 3 for 12 wo rats. Data are mean \pm SEM; * $P < 0.00001$; Student's *t*-test.

SHR and WKy rats were normotensive; 8 wo SHR showed no significant increase in blood pressure, and 12 wo SHR were clearly hypertensive. Systolic arterial blood pressure levels were (in mm Hg) 111 \pm 2 for 6 wo SHR, 135 \pm 3 for 8 wo SHR, and 173 \pm 4 for 12 wo SHR; for WKy, blood pressure levels were 98 \pm 4 for 6 wo rats, 128 \pm 4 for 8 wo rats, and 117 \pm 3 for 12 wo rats; $P < 0.00001$ when comparing 12 wo SHR with the other groups (Figure 1).

3.1. Ganglia from Prehypertensive Young SHR Showed Train-Evoked LTP, While Ganglia from Hypertensive Adult SHR Did Not Express Train-Evoked LTP. In SCG from prehypertensive 6 wo SHR, a high-frequency stimulation train of 40 Hz for 3 s evoked a robust LTP (LTP decay of 284 \pm 47 min and LTP extent of 72 \pm 22 a.u.; Figures 2(a) and 2(b)). By contrast, SCG from adult hypertensive SHR did not show a train-evoked gLTP, the amplitude of the ratio $\Delta R/R_0$ decreased rapidly to reach the baseline value (20% potentiation) in less than 15 min after stimulation (LTP decay of 10 \pm 2 min and LTP extent of 6 \pm 1 a.u.), which was significantly smaller than SCG from 6 wo SHR ($P = 0.004$ and $P = 0.006$ for LTP decay and LTP extent, respectively).

To determine the presence of sympathetic hyperactivity, we characterized basal transmission of the SCG from SHR and WKy rats using *I/O* curves. We found that 12 wo SHR ganglia exhibited a larger response compared with ganglia from age-matched WKy rats, V_{\max} 2.7 \pm 0.2 mV vs. 1.7 \pm 0.1 mV ($P < 0.0007$; Figure 3(b)). We detected that SCG from prehypertensive 6 wo SHR did not show changes in basal transmission compared with WKy rats (Figure 3(a)). Finally, we found that the amplitude of CAPs was smaller in 6 wo than in 12 wo SHR (V_{\max} 2.7 \pm 0.2 for 12 wo vs. 1.0 \pm 0.1 for 6 wo; $P < 0.001$).

In WKy rats, we found a different pattern of train-evoked gLTP expression, viz., SCG from 12 wo rats expressed train-

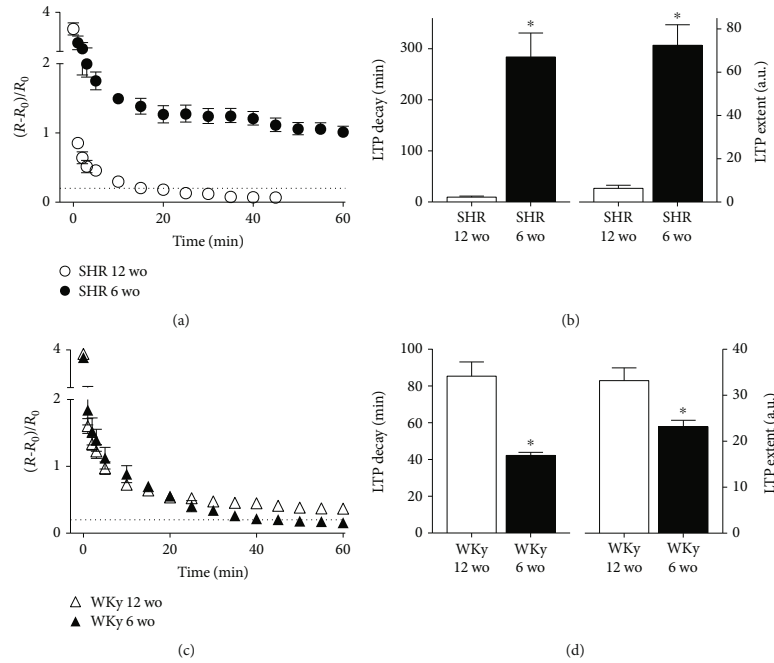


FIGURE 2: SCG of SHR expressed LTP at 6 wo but not at 12 wo. (a) Time course of synaptic potentiation expressed as $\Delta R/R_0$ (mean \pm SEM) and recorded in ganglia isolated from young (6 wo) SHR (black circles) and adult (12 wo) hypertensive SHR (white circles). Bar plots of LTP parameters analyzed showing that LTP was expressed in 6 wo SHR, whereas it was not present in 12 wo SHR animals (LTP decay of 284 ± 47 min and LTP extent of 72 ± 22 a.u. for 6 wo SHR ($n=5$) and LTP decay of 10 ± 2 min and LTP extent of 6 ± 1 a.u. for 12 wo SHR ($n=6$); $P=0.004$ and $P=0.006$, respectively). (c) Time course of synaptic potentiation, $\Delta R/R_0$ (mean \pm SEM), recorded in ganglia isolated from 6 wo (black triangles) and 12 wo WKy rats (white triangles). (d) LTP was not expressed in SCG of 6 wo WKy rats, but was expressed in 12 wo WKy rats (LTP decay of 42 ± 2 min and LTP extent of 23 ± 1 a.u. for 6 wo WKy rats ($n=5$) and LTP decay of 85 ± 8 min and LTP extent of 33 ± 3 a.u. for 12 wo WKy rats ($n=11$); $P=0.0002$ and $P=0.039$, respectively). Dotted lines in (a) and (c) indicate the LTP baseline value (0.2).

evoked LTP (LTP decay of 85 ± 8 min and LTP extent of 33 ± 3 a.u.), whereas ganglia of 6 wo rats expressed a short-lasting train-evoked potentiation; the amplitude of the ratio $\Delta R/R_0$ dropped to baseline value in approximately 40 min, with a LTP decay of 42 ± 2 min and a LTP extent of 23 ± 1 a.u., which were significantly less than gLTP from 12 wo WKy rats ($P=0.0002$ and $P=0.039$ for LTP decay and LTP extent, respectively; Figures 2(c) and 2(d)).

3.2. Ganglia from 8 wo SHR Expressed Evoked LTP. Considering the differences observed between young and adult SHR, we explored the expression of evoked LTP in ganglia from SHR with an intermediate age of 8 wo. We found that ganglia from SHR of this age expressed a train-evoked LTP similar to that found in WKy rats (Figure 4). We obtained a LTP decay of 74 ± 11 min and a LTP extent of 28 ± 2 a.u. for SHR and a LTP decay of 90 ± 13 min and a LTP extent of 31 ± 2 a.u. for WKy ($P > 0.05$ for both parameters, LTP decay and LTP extent; Figure 4(b)).

3.3. Blockade of GABA-A Subtype Receptors in SCG of Adult SHR Disclosed LTP. Taking into account the inhibitory effect of endogenous GABA on gLTP found in Wistar rats [30, 34], we wondered if endogenous GABA has a similar inhibitory effect on gLTP evoked in SHR. To investigate this possibility, we used bicuculline, an antagonist of GABA-A subtype receptor, and found that blockade of likely endogenous GABA inhibition unmasked the appearance of train-evoked LTP in the SCG of adult SHR (Figures 5(a) and 5(b)). In the presence of bicuculline, gLTP was 94 ± 9 min (LTP decay) and LTP extent reached 37 ± 2 a.u., significantly greater than in conditions without bicuculline ($P=0.0002$ for LTP decay and $P=0.004$ for LTP extent). Additionally, and considering the short-lasting evoked potentiation found in SCG of 6 wo WKy, we also tested whether endogenous GABA was downregulating LTP at this age. We found that bicuculline indeed unmasked a robust LTP of 414 ± 103 min decay and 86 ± 11 a.u. extent in ganglia from 6 wo WKy rats, values that were significantly

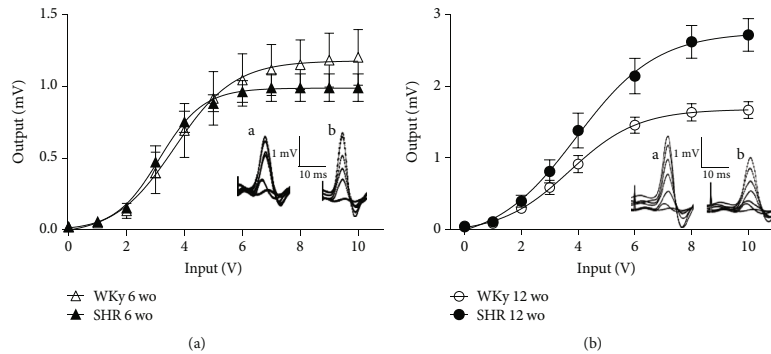


FIGURE 3: Ganglia from SHR displayed stronger basal transmission at adult age (12 wo) than WKy rats of the same age, while in young (6 wo) rats, transmission was similar in both groups. (a) Input/output curve of ganglionic transmission recorded in the postganglionic nerve of SCG from 6 wo SHR (black triangles; $n = 5$) and age-matched WKy rats (white triangles; $n = 5$). Ganglionic transmission is similar in both groups. (b) Input/output curve of ganglionic transmission recorded in a similar way as in (a) from 12 wo SHR (black circles; $n = 12$) and 12 wo WKy rats (white circles; $n = 10$). Stimuli of similar amplitude evoked a greater response in ganglia from SHR than from WKy rats ($V_{\max} 2.7 \pm 0.2$ mV vs. 1.7 ± 0.1 mV; SHR vs. WKy; $P < 0.0007$). Insets show sets of compound action potentials (CAPs) from SHR (a) and WKy rats (b) elicited at increasing voltage of stimulation. Note that output scales are different.

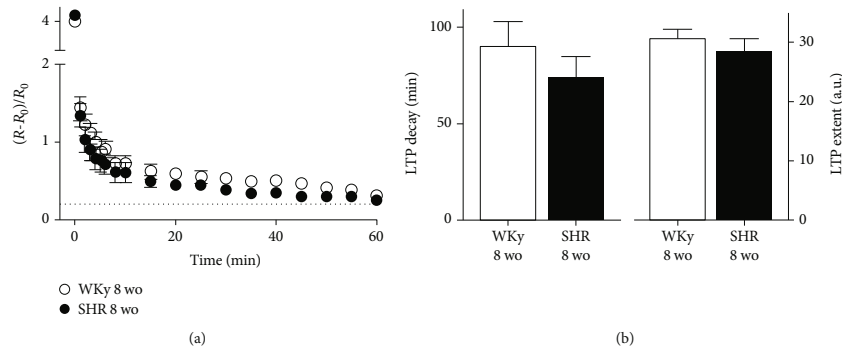


FIGURE 4: LTP of normal amplitude was expressed in SCG from both SHR and WKy rats at an intermediate age (8 wo). (a) Time course of synaptic potentiation, expressed as $\Delta R/R_0$ (mean \pm SEM), and recorded in ganglia isolated from SHR (black circles; $n = 6$) and WKy (white circles; $n = 6$) at 8 wo. (b) Bar plots of LTP parameters showing that both SCG from SHR and WKy expressed LTP with values within the ranges of LTP control (LTP decay of 74 ± 11 min and LTP extent of 28 ± 2 a.u. for SHR and LTP decay of 90 ± 13 min and LTP extent of 31 ± 2 a.u. for WKy; $P > 0.05$ for both LTP decay and LTP extent). Dotted line in (a) indicates the LTP baseline (0.2).

larger than the evoked LTP without bicuculline; $P = 0.023$ for LTP decay and $P = 0.004$ for LTP extent (Figures 5(c) and 5(d)).

Considering the frequency range of spontaneous activity of sympathetic preganglionic neurons, 10–20 Hz [45, 46], we characterized evoked gLTP in response to a train of 10 Hz for 12 s. We found that in SHR and WKy rats, this train of stimulation induced gLTP, which reproduced all features found previously using a 40 Hz train. There was no LTP in SCG from 12 wo SHR (LTP decay of 12 ± 3 min and LTP extent of 8 ± 1 a.u.), but there was expression in SCG of

6 wo SHR (LTP decay of 157 ± 17 min and LTP extent of 46 ± 4 a.u.). GABA antagonist unmasked the expression of LTP in SCG from adult SHR (data not shown).

4. Discussion

The data presented here demonstrated that gLTP can be evoked in SHR at a young age (6 wo) before the onset of hypertension, and the known lack expression of gLTP in adult (12 wo) SHR can be reverted by antagonizing endogenous ganglionic GABA inhibition.

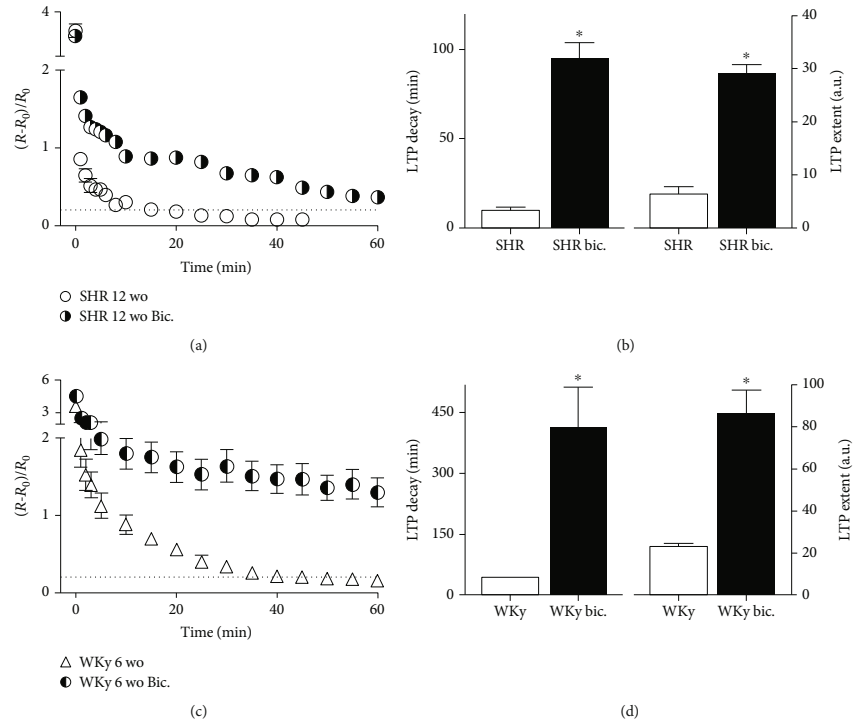


FIGURE 5: GABA-A receptors modulated LTP in SCG from adult (12 wo) SHR and young (6 wo) WKy rats. (a) Time course of synaptic potentiation, $\Delta R/R_0$ (mean \pm SEM) recorded in SCG from 12 wo SHR in the absence (white circles) and presence of 2 μ M bicuculline (half-full circles). (b) Bar plots of LTP decay and LTP extent showing that LTP was unmasked by GABA-A blockade (LTP decay of 94 \pm 9 min and LTP extent of 37 \pm 2 a.u. for GABA-A subtype receptor blockade by bicuculline ($n = 6$) and LTP decay of 10 \pm 2 min and LTP extent of 6 \pm 1 a.u. without bicuculline ($n = 6$); $P = 0.002$ and $P = 0.004$, respectively). (c) Time course of synaptic potentiation, $\Delta R/R_0$ (mean \pm SEM) recorded in SCG from 6 wo WKy rats in the absence (white triangles) and in the presence of 2 μ M bicuculline (half-full circles). (d) Bar plots of LTP decay and LTP extent showing that GABA-A blockade recovered LTP expression of SCG of 6 wo WKy rats (LTP decay of 414 \pm 104 min and LTP extent of 86 \pm 11 a.u. for GABA blockade by bicuculline ($n = 5$) and LTP decay of 42 \pm 2 min and LTP extent of 23 \pm 1 a.u. without bicuculline ($n = 5$); $P = 0.023$ and $P = 0.004$, respectively). Dotted lines in (a) and (c) indicate the LTP baseline (0.2).

The expression of evoked gLTP in prehypertensive 6 wo SHR indicates that synaptic plasticity changed before the manifestation of hypertension. Other changes in synaptic plasticity such as reduction in LTP and in short-term facilitation in SCG of adult hypertensive SHR have been described previously [17, 21]. To our knowledge, data reported here are the first evidence that changes in the synaptic plasticity of SCG occurred in SHR at early ages before hypertension develops. Although, there is currently controversy regarding the age of hypertension onset in SHR animals [24, 47], we and others found that 6 wo SHR are normotensive [25, 35, 38, 48].

Our study of ganglionic basal transmission in SHR confirmed that it is increased in adults, as previously reported by Magee and Schofield [17]. By contrast, in juvenile prehypertensive 6 wo SHR, although there was an increase in gLTP,

basal ganglionic activity did not increase, as shown in the I/O curve of ganglia from 6 wo SHR which was not different from the control normotensive 6 wo WKy. However, there are some reports of sympathetic hyperactivity in SHR before the development of hypertension [23–25]. This apparent contradiction may be because ganglionic basal transmission did not increase at 6 wo, but probably later, unlike the other parameters used to assess sympathetic activity.

As expected, adult WKy rats expressed a normal evoked gLTP, while 6 wo WKy were unable to express it. These findings suggest that the mechanisms responsible for gLTP in normal conditions such as in WKy rats require a maturation process that is faster in SHR, where ganglia at 6 wo expressed LTP. In line with this idea, it is known that gLTP is an age-dependent neuroplastic phenomenon [21, 49]. To explore the possibility that gLTP occurs in SHR of an intermediate

age, we examined whether ganglia of 8 wo rats were able to express gLTP. We found that at this age gLTP was expressed in SHR, as well as in WKy, which supports the idea of a divergent time course of gLTP expression between SHR and WKy as rats mature.

Our second main finding was the presence of endogenous GABAergic inhibition of gLTP in adult SHR. We found that evoked gLTP in 12 wo SHR was masked by endogenous GABA, because the antagonism of GABA-A receptors by bicuculline unmasked the potentiation phenomenon. In support of this role of GABA, we have recently reported a greater presence of GABA-containing sympathetic varicosities in SCG of 12 wo SHR by comparison with WKy rats [38]. This effect of endogenous GABA might be related with reports of GABAergic antihypertensive effect in SHR. For instance, administration of GABA or the GABA-A receptor agonist muscimol into the lateral brain ventricle or into the hypothalamic paraventricular nucleus lowered mean arterial blood pressure in stroke prone SHR [39–41]. We are aware that bicuculline has actions other than as a GABA-A receptor antagonist [50]; for instance, it also acts on small-conductance calcium-activated potassium channels [51], which are responsible for the afterhyperpolarization in the SCG [52]. However these channels make a small contribution to the nicotinic-evoked ganglionic action potential [53]. More importantly, a lack of this conductance in SCG neurons from SHR has been reported [54]; therefore, it is more likely that bicuculline action is limited to GABA-A receptor blockade.

The findings of an increase in the presence and inhibitory function of GABA in the SCG of SHR were unexpected, taking into account that GABA decreases in the caudal hypothalamus of SHR (sympathetic central nucleus), detected as a reduction in GAD gene expression, resulting in the sympathetic overdrive found in hypertension [55]. A hypothetical explanation for these results is that organisms increase GABA presence in sympathetic ganglia as an effort to counteract the sympathetic overactivity observed in hypertension. An increase in basal transmission was accompanied by a reduction in gLTP; these opposite findings can be explained if we take into account the different cellular mechanisms for LTP and basal transmission (complex and multifactorial process and neurotransmitter release and receptor activation, respectively). It would be expected that an increase in GABA affects mechanisms of gLTP but not those related to basal transmission.

One probable mechanism that might participate in the reduction of LTP in SHR is increasing Cl efflux, similar to the increase found in vascular smooth muscle of the SHR [56]. In line with this assumption, Gonzalez-Burgos et al. [34] found that picrotoxin, a GABA receptor-chloride channel blocker, antagonizes the GABA-mediated inhibition of gLTP.

gLTP was fully expressed in 6 wo SHR, despite the greater presence of GABA [38]. This can be explained by a larger segregation of ACh and GABA detected at 6 wo [38], which would reduce GABA inhibition [30]. By contrast with SHR, in WKy rats, endogenous GABA did not affect the expression of gLTP in 12 wo animals, but did mask the expression at 6 wo. It is possible that in WKy rats, GABA inhibition of

gLTP was high at early ages and decreased as rats mature. Similar GABA downregulation during development has been reported in some regions of the central nervous system [57, 58].

Enhancement in gLTP is associated with the development or aggravation of hypertension in various animal models [59, 60]. The increase of gLTP would induce and reinforce sympathetic tone to all target organs, including blood vessels, resulting in an increase in peripheral vessel resistance leading to elevated blood pressure [13]. Alkadhi et al. [59] proposed that the increase in endogenous gLTP in SHR occludes evoked gLTP; however, our data showing unmasking of evoked gLTP by GABA-A subtype receptor blockade by bicuculline challenge this assumption, and suggest that a lack of evoked gLTP in adult SHR is rather due to an increase in endogenous GABA inhibition. Alternative contribution of gLTP to the mechanisms of hypertension has been proposed in other animal models of hypertension, e.g., in the ouabain-dependent model and in the (mRen2)²⁷ transgenic rat model of hypertension, a role for angiotensin II has been suggested [61, 62]. Likewise, in control normotensive rats, 5-HT may play a role in both gLTP and in the control of blood pressure [63]. However, endogenous GABAergic modulation of gLTP was not explored in those studies.

To our knowledge, the present study provides the first evidence that changes in neuroplasticity in the SNS occurred before the onset of the increase in blood pressure, raising the possibility that these changes might be involved in the origin of hypertension. The data also indicate the presence of changes in the modulatory effect of endogenous GABA on gLTP during hypertension and in early ages of normotensive control animals. The early expression of gLTP would imply stronger sympathetic outflow to targets, promoting sustained increase in vascular peripheral resistance.

Data Availability

Most of the experimental data used to support the findings of this study are included within the article; some others are from previously reported studies, which have been properly cited.

Conflicts of Interest

The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

Acknowledgments

We thank Mr. Pedro Medina for his technical assistance. This work was supported by DGAPA-PAPIIT (Grants #IN210515 and #IN213919) and CONACYT-México (Grant #236903). LAM is a doctoral student from the Programa de Doctorado en Ciencias Biomédicas de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM). He received a scholarship from Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología- (CONACYT) México (Grant #306013), and this article is part of his thesis.

References

- [1] R. B. Livingston, "Visceral control mechanisms," in *Best and Taylor's Physiological Basis of Medical Practice*, J. B. West, Ed., pp. 1053–1067, Williams and Wilkins, Baltimore, 12th edition, 1990.
- [2] P. G. Guyenet, "The sympathetic control of blood pressure," *Nature Review Neuroscience*, vol. 7, no. 5, pp. 335–346, 2006.
- [3] F. Cifuentes, E. R. Arias, and M. A. Morales, "Long-term potentiation in mammalian autonomic ganglia: an inclusive proposal of a calcium-dependent, trans-synaptic process," *Brain Research Bulletin*, vol. 97, pp. 32–38, 2013.
- [4] T. Brown and D. McAfee, "Long-term synaptic potentiation in the superior cervical ganglion," *Science*, vol. 215, no. 4538, pp. 1411–1413, 1982.
- [5] C. A. Briggs, T. H. Brown, and D. A. McAfee, "Neurophysiology and pharmacology of long-term potentiation in the rat sympathetic ganglion," *The Journal of Physiology*, vol. 359, no. 1, pp. 503–521, 1985.
- [6] F. Alonso-deFlorida, M. A. Morales, and A. A. Minzoni, "Modulated long-term potentiation in the cat superior cervical ganglion in vivo," *Brain Research*, vol. 544, no. 2, pp. 203–210, 1991.
- [7] K. A. Alkadhi, D. Salgado-Commissariat, Y. H. Hogan, and S. B. Akpaudo, "Induction and maintenance of ganglionic long-term potentiation require activation of 5-hydroxytryptamine (5-HT₃) receptors," *The Journal of Physiology*, vol. 496, no. 2, pp. 479–489, 1996.
- [8] E. Southam, S. L. Charles, and J. Garthwaite, "The nitric oxide-cyclic GMP pathway and synaptic plasticity in the rat superior cervical ganglion," *British Journal of Pharmacology*, vol. 119, no. 3, pp. 527–532, 1996.
- [9] Y. H. Hogan, R. Hawkins, and K. A. Alkadhi, "Adenosine A1 receptor activation inhibits LTP in sympathetic ganglia," *Brain Research*, vol. 807, no. 1–2, pp. 19–28, 1998.
- [10] F. Cifuentes, I. I. Licona, L. De León, P. Medina, F. F. De-Miguel, and M. A. Morales, "Contribution of different calcium channels to long-term potentiation in superior cervical ganglion of the rat," *Neuroscience*, vol. 129, no. 3, pp. 647–653, 2004.
- [11] R. Vargas, F. Cifuentes, and M. A. Morales, "Differential contribution of extracellular and intracellular calcium sources to basal transmission and long-term potentiation in the sympathetic ganglion of the rat," *Developmental Neurobiology*, vol. 67, no. 5, pp. 589–602, 2007.
- [12] R. Vargas, F. Cifuentes, and M. A. Morales, "Role of presynaptic and postsynaptic IP₃-dependent intracellular calcium release in long-term potentiation in sympathetic ganglion of the rat," *Synapse*, vol. 65, no. 5, pp. 441–448, 2011.
- [13] K. Alkadhi and K. Alzoubi, "Role of long-term potentiation of sympathetic ganglia (gLTP) in hypertension," *Clinical and Experimental Hypertension*, vol. 29, no. 5, pp. 267–286, 2007.
- [14] P. Yarowsky and D. Weinreich, "Loss of accommodation in sympathetic neurons from spontaneously hypertensive rats," *Hypertension*, vol. 7, no. 2, pp. 268–276, 1985.
- [15] M. Esler, G. Lambert, and G. Jennings, "Regional norepinephrine turnover in human hypertension," *Clinical and Experimental Hypertension. Part A: Theory and Practice*, vol. 11, Supplement 1, pp. 75–89, 1989.
- [16] M. Esler, C. Ferrier, G. Lambert, G. Eisenhofer, H. Cox, and G. Jennings, "Biochemical evidence of sympathetic hyperactivity in human hypertension," *Hypertension*, vol. 17, 4_Supplement, pp. III29–III35, 1991.
- [17] J. C. Magee and G. G. Schofield, "Alterations of synaptic transmission in sympathetic ganglia of spontaneously hypertensive rats," *The American Journal of Physiology*, vol. 267, no. 5, pp. R1397–R1407, 1994.
- [18] P. Segura-Chama, A. Hernández, N. Jiménez-Pérez et al., "Comparison of Ca²⁺ currents of chromaffin cells from normotensive Wistar Kyoto and spontaneously hypertensive rats," *Cellular and Molecular Neurobiology*, vol. 30, no. 8, pp. 1243–1250, 2010.
- [19] P. Segura-Chama, P. López-Bistrain, E. M. Pérez-Armendáriz, N. Jiménez-Pérez, D. Millán-Aldaco, and A. Hernández-Cruz, "Enhanced Ca²⁺-induced Ca²⁺ release from intracellular stores contributes to catecholamine hypersecretion in adrenal chromaffin cells from spontaneously hypertensive rats," *Pflügers Archiv*, vol. 467, no. 11, pp. 2307–2323, 2015.
- [20] G. Grassi, "Sympathomodulatory effects of antihypertensive drug treatment," *American Journal of Hypertension*, vol. 29, no. 6, pp. 665–675, 2016.
- [21] K. H. Alzoubi, A. M. Aleisa, and K. A. Alkadhi, "In vivo expression of ganglionic long-term potentiation in superior cervical ganglia from hypertensive aged rats," *Neurobiology of Aging*, vol. 31, no. 5, pp. 805–812, 2010.
- [22] G. Noll, R. R. Wenzel, M. Schneider et al., "Increased activation of sympathetic nervous system and endothelin by mental stress in normotensive offspring of hypertensive parents," *Circulation*, vol. 93, no. 5, pp. 866–869, 1996.
- [23] A. Cabassi, S. Vinci, M. Calzolari, G. Bruschi, and A. Borghetti, "Regional sympathetic activity in pre-hypertensive phase of spontaneously hypertensive rats," *Life Sciences*, vol. 62, no. 12, pp. 1111–1118, 1998.
- [24] A. E. Simms, J. F. R. Paton, A. E. Pickering, and A. M. Allen, "Amplified respiratory-sympathetic coupling in the spontaneously hypertensive rat: does it contribute to hypertension?" *The Journal of Physiology*, vol. 587, no. 3, pp. 597–610, 2009.
- [25] D. Li, C. W. Lee, K. Buckler, A. Parekh, N. Herring, and D. J. Paterson, "Abnormal intracellular calcium homeostasis in sympathetic neurons from young prehypertensive rats," *Hypertension*, vol. 59, no. 3, pp. 642–649, 2012.
- [26] J. R. Wolff, F. Joó, P. Kása, J. Storm-Mathiesen, J. Toldi, and V. J. Balcar, "Presence of neurons with GABA-like immunoreactivity in the superior cervical ganglion of the rat," *Neuroscience Letters*, vol. 71, no. 2, pp. 157–162, 1986.
- [27] J. R. Wolff, P. Kása, E. Dobó, R. J. Wenthold, and F. Joo, "Quantitative analysis of the number and distribution of neurons richly innervated by GABA-immunoreactive axons in the rat superior cervical ganglion," *The Journal of Comparative Neurology*, vol. 282, no. 2, pp. 264–273, 1989.
- [28] E. Dobó, P. Kása, R. J. Wenthold, F. Joó, and J. R. Wolff, "Evidence for GABAergic fibers entering the superior cervical ganglion of rat from the preganglionic nerve trunk," *Histochemistry*, vol. 92, no. 2, pp. 133–136, 1989.
- [29] T. Ito, H. Hioki, K. Nakamura et al., "Gamma-aminobutyric acid-containing sympathetic preganglionic neurons in rat thoracic spinal cord send their axons to the superior cervical ganglion," *The Journal of Comparative Neurology*, vol. 502, no. 1, pp. 113–125, 2007.
- [30] D. Elinos, R. Rodríguez, L. A. Martínez, M. E. Zetina, F. Cifuentes, and M. A. Morales, "Segregation of acetylcholine and GABA in the rat superior cervical ganglia: functional

- correlation," *Frontiers in Cellular Neuroscience*, vol. 10, no. 91, 2016.
- [31] W. C. de Groat, "The actions of gamma-aminobutyric acid and related amino acids on mammalian autonomic ganglia," *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, vol. 172, no. 2, pp. 384–396, 1970.
- [32] N. G. Bowery and D. A. Brown, " γ -Aminobutyrylcholine: actions on GABA and acetylcholine receptors," *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, vol. 24, no. 8, pp. 663–666, 1972.
- [33] G. R. González Burgos, F. I. Biali, L. C. Nicola Siri, and D. P. Cardinali, "Effect of gamma-aminobutyric acid on synaptic transmission and long-term potentiation in rat superior cervical ganglion," *Brain Research*, vol. 658, no. 1–2, pp. 1–7, 1994.
- [34] G. R. González Burgos, F. I. Biali, and D. P. Cardinali, "Picrotoxin-sensitive receptors mediate gamma-aminobutyric acid-induced modulation of synaptic plasticity in rat superior cervical ganglion," *Brain Research*, vol. 751, no. 1, pp. 148–151, 1997.
- [35] D. P. Li and H. L. Pan, "Plasticity of GABAergic control of hypothalamic presympathetic neurons in hypertension," *American Journal of Physiology. Heart and Circulatory Physiology*, vol. 290, no. 3, pp. H1110–H1119, 2006.
- [36] V. Magnaghi, M. Ballabio, A. Consoli, J. J. Lambert, I. Roglio, and R. C. Melcangi, "GABA receptor-mediated effects in the peripheral nervous system: a cross-interaction with neuroactive steroids," *Journal of Molecular Neuroscience*, vol. 28, no. 1, pp. 89–102, 2006.
- [37] F. Joó, L. Siklós, W. Dames, and J. R. Wolff, "Fine-structural changes of synapses in the superior cervical ganglion of adult rats after long-term administration of GABA. A morphometric analysis," *Cell and Tissue Research*, vol. 249, no. 2, pp. 267–275, 1987.
- [38] C. Merino-Jiménez, F. Miguel, J. A. Feria Pliego, M. E. Zetina Rosales, F. Cifuentes, and M. A. Morales, "Sympathetic hyperactivity and age affect segregation and expression of neurotransmitters," *Frontiers in Cellular Neuroscience*, vol. 12, p. 411, 2018.
- [39] T. Unger, H. Becker, R. Dietz et al., "Antihypertensive effect of the GABA receptor agonist muscimol in spontaneously hypertensive rats. Role of the sympathoadrenal axis," *Circulation Research*, vol. 54, no. 1, pp. 30–37, 1984.
- [40] A. M. Allen, "Inhibition of the hypothalamic paraventricular nucleus in spontaneously hypertensive rats dramatically reduces sympathetic vasomotor tone," *Hypertension*, vol. 39, no. 2, pp. 275–280, 2002.
- [41] A. Akine, M. Montanaro, and A. M. Allen, "Hypothalamic paraventricular nucleus inhibition decreases renal sympathetic nerve activity in hypertensive and normotensive rats," *Autonomic Neuroscience*, vol. 108, no. 1–2, pp. 17–21, 2003.
- [42] E. R. Arias, P. Valle-Leija, M. A. Morales, and F. Cifuentes, "Differential contribution of BDNF and NGF to long-term potentiation in the superior cervical ganglion of the rat," *Neuropharmacology*, vol. 81, pp. 206–214, 2014.
- [43] M. Bachoo and C. Polosa, "Long-term potentiation of nicotinic transmission by a heterosynaptic mechanism in the stellate ganglion of the cat," *Journal of Neurophysiology*, vol. 65, no. 3, pp. 639–647, 1991.
- [44] R. B. Banks, *Growth and Diffusion Phenomena: Mathematical Frameworks and Applications*, Springer-Verlag, Berlin, 1994.
- [45] C. Polosa, "Spontaneous activity of sympathetic preganglionic neurons," *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology*, vol. 46, no. 6, pp. 887–896, 1968.
- [46] A. O. Stalbovskiy, L. J. B. Briant, J. F. R. Paton, and A. E. Pickering, "Mapping the cellular electrophysiology of rat sympathetic preganglionic neurones to their roles in cardio-respiratory reflex integration: a whole cell recording study in situ," *The Journal of Physiology*, vol. 592, no. 10, pp. 2215–2236, 2014.
- [47] J. G. Dickhout and R. M. Lee, "Blood pressure and heart rate development in young spontaneously hypertensive rats," *The American Journal of Physiology*, vol. 274, no. 3, pp. H794–H800, 1998.
- [48] R. M. Lee, K. R. Borkowski, F. H. Leenen, J. Tsoaporis, and M. Coughlin, "Combined effect of neonatal sympathectomy and adrenal demedullation on blood pressure and vascular changes in spontaneously hypertensive rats," *Circulation Research*, vol. 69, no. 3, pp. 714–721, 1991.
- [49] R. Wu, D. G. McKenna, and D. A. McAfee, "Age-related changes in the synaptic plasticity of rat superior cervical ganglia," *Brain Research*, vol. 542, no. 2, pp. 324–329, 1991.
- [50] G. A. Johnston, "Advantages of an antagonist: bicuculline and other GABA antagonists," *British Journal of Pharmacology*, vol. 169, no. 2, pp. 328–336, 2013.
- [51] R. Khawaled, A. Bruening-Wright, J. P. Adelman, and J. Maylie, "Bicuculline block of small-conductance calcium-activated potassium channels," *Pflügers Archiv European Journal of Physiology*, vol. 438, no. 3, pp. 314–321, 1999.
- [52] D. A. McAfee and P. J. Yarowsky, "Calcium-dependent potentials in the mammalian sympathetic neurone," *The Journal of Physiology*, vol. 290, no. 2, pp. 507–523, 1979.
- [53] T. Kawai and M. Watanabe, "Blockade of Ca-activated K conductance by apamin in rat sympathetic neurones," *British Journal of Pharmacology*, vol. 87, no. 1, pp. 225–232, 1986.
- [54] B. C. Jubelin and M. S. Kannan, "Neurons from neonatal hypertensive rats exhibit abnormal membrane properties in vitro," *American Journal of Physiology-Cell Physiology*, vol. 259, no. 3, pp. C389–C396, 1990.
- [55] H. R. Little, J. M. Kramer, J. A. Beatty, and T. G. Waldrop, "Chronic exercise increases GAD gene expression in the caudal hypothalamus of spontaneously hypertensive rats," *Brain Research. Molecular Brain Research*, vol. 95, no. 1–2, pp. 48–54, 2001.
- [56] Z. Wang, Q. Chai, Z. Liu, D. Liu, and L. Chen, "Chloride channel activity of vascular smooth muscle in the spontaneous hypertensive rats," *Chinese Journal of Physiology*, vol. 47, no. 3, pp. 129–135, 2004.
- [57] R. Gutiérrez, H. Romo-Parra, J. Maqueda et al., "Plasticity of the GABAergic phenotype of the "glutamatergic" granule cells of the rat dentate gyrus," *The Journal of Neuroscience*, vol. 23, no. 13, pp. 5594–5598, 2003.
- [58] J. Somogyi, "Functional significance of co-localization of GABA and Glu in nerve terminals: a hypothesis," *Current Topics in Medicinal Chemistry*, vol. 6, no. 10, pp. 969–973, 2006.
- [59] K. A. Alkadhi, S. A. Ootom, F. L. Tanner, D. Sockwell, and Y. H. Hogan, "Inhibition of ganglionic long-term potentiation decreases blood pressure in spontaneously hypertensive rats," *Experimental Biology and Medicine*, vol. 226, no. 11, pp. 1024–1030, 2001.
- [60] N. Z. Gerges, A. M. Aleisa, A. A. Alhaider, and K. A. Alkadhi, "Reduction of elevated arterial blood pressure in obese Zucker

- rats by inhibition of ganglionic long-term potentiation," *Neuropharmacology*, vol. 43, no. 7, pp. 1070–1076, 2002.
- [61] A. A. Aileru, A. De Albuquerque, J. M. Hamlyn et al., "Synaptic plasticity in sympathetic ganglia from acquired and inherited forms of ouabain-dependent hypertension," *American Journal of Physiology. Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, vol. 281, no. 2, pp. R635–R644, 2001.
- [62] A. A. Aileru, E. Logan, M. Callahan, C. M. Ferrario, D. Ganten, and D. I. Diz, "Alterations in sympathetic ganglionic transmission in response to angiotensin II in (mRen2)27 transgenic rats," *Hypertension*, vol. 43, no. 2, pp. 270–275, 2004.
- [63] K. Alkadhi, K. Alzoubi, and A. Aleisa, "Plasticity of synaptic transmission in autonomic ganglia," *Progress in Neurobiology*, vol. 75, no. 2, pp. 83–108, 2005.

Artículo en proceso de publicación

Autonomic Neuroscience: Basic and Clinical

Full Length Article | AUTNEU_2019_171

Long-term potentiation is differentially expressed in rostral and caudal neurons in the superior cervical ganglion of normal and hypertensive rats.

Miguel Morales, Luis Martínez, Raúl Rodríguez Cruces, Fredy Cifuentes

Submitted 30 Aug 2019

Revision Requested 23 Oct 2019 ⓘ

[View PDF >](#)