

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE QUIMICA



“FOSFORILACION DE PROTEINAS DE MEMBRANAS
SINAPTICAS A CONSECUENCIA DE ESTIMULA-
CION ELECTRICA EN GANGLIO CERVICAL
SUPERIOR DE RATA”

240

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE
Q U I M I C O
P R E S E N T A :
JORGE MOLINA TORRES

1975



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.

Test 1

ABQ 1975

BCHA

PROC H1 230



QUING.

JURADO ASIGNADO ORIGINALMENTE SEGUN EL TEMA

PRESIDENTE	GRACIELA MEZA RUIZ
VOCAL	ALEJANDRO BLANCO LABRA
SECRETARIO	ALEJANDRO BAYON CASO
1er. SUPLENTE	MA. DOLORES LASTRA AZPILICUETA
2o. SUPLENTE	ROCIO SALCEDA SAKANELLES.

**TEMA DESARROLLADO EN: CENTRO DE INVESTIGACION Y DE ESTUDIOS
AVANZADOS DEL I. P. N.**

SUSTENTANTE: JORGE MOLINA TORRES

M en C ALEJANDRO BAYON

ASESOR DEL TEMA

DR. VICTOR ALEMAN

SUPERVISOR TECNICO

DEDICATORIA

A MERCURIO

A ROCIO

A MIS PADRES

Y

A QUIEN PUEDA INTERESARLE ESTE ESTUDIO

CONTENIDO

	Pag.
INTRODUCCION	1
GENERALIDADES	4
EL SISTEMA DEL AMP cíclico	8
ADENIL - CICLASA	10
FOSFODIESTERASA	13
PROTEINA-CINASAS DEPENDIENTES DE NUCLEOTIDOS CICLICOS	15
PROPIEDADES DE PROTEINA-CINASAS DEPENDIENTES DE AMP cíclico EN SISTEMA NERVIOSO	18
SUSTRATO DE PROTEINA-CINASAS DEPENDIENTES DE AMP cíclico EN SISTEMA NERVIOSO	20
FOSFOPROTEINA-FOSFATASAS EN SISTEMA NERVIOSO	24
GANGLIO CERVICAL SUPERIOR	
1. Localización y dimensiones	26
2. Fibras aferentes	27
3. Fibras eferentes	28
4. Funciones regulatorias	28

PARTE EXPERIMENTAL

MATERIAL Y METODOS

1. Material biológico y anestesia	31
2. Disección	31
3. Metodología	32
a) Electro estimulación <u>in vivo</u>	32
b) Incubación y electroestimulación <u>in vitro</u>	34
4. Cámaras de incubación y electrodos	39
5. Control de oxigenación y temperatura	43
6. Dispositivos de estimulación y registro	45

ENSAYO ELECTROFISIOLOGICO

1. Propiedades de conducción de la fibra preganglionar	48
2. Respuesta transganglionar	48
3. Condiciones metabólicas y funcionales del GCS <u>in vitro</u>	49

ENSAYO BIOQUIMICO

1. Fraccionamiento subcelular del ganglio	52
2. Preparación de muestras para microscopía electrónica	56
3. Determinación de (^{32}P)-Fosfato incorporado a proteínas	58
4. Electroforesis en geles de acrilamida	59
5. Métodos de incubación del ganglio	62
a) Incorporación de (^{32}P)-fosfato en condiciones basales	62
b) Incorporación de (^{32}P)-fosfato a proteína inducida por estimulación eléctrica	64
RESULTADOS	66
DISCUSION Y CONCLUSIONES	88
REFERENCIAS	97
RECONOCIMIENTO	110
INDICE DE FIGURAS	111

Lo siento - dijo el Mochuelo - pero tengo que contradecir al Cuervo, mi ilustre amigo y colega. Para mí, el muñeco está vivo; pero si por desgracia no estuviera vivo, entonces sería señal de que estaba verdaderamente muerto.

Le Avventure di Pinocchio

INTRODUCCION

La aplicación de la bioquímica en el sistema nervioso ha producido resultados que poco a poco se integran al avance general en el conocimiento de la mente. Las neuronas son células altamente diferenciadas que han ofrecido gran cantidad de datos específicos a los estudios fisiológicos pero hasta muy recientemente se han estudiado sus características bioquímicas para la explicación molecular de las observaciones fisiológicas.

Un problema que atrae la atención de varios grupos de investigación es la organización subcelular que implica la comunicación interneuronal. Esta intercomunicación se lleva a cabo principalmente en las zonas de aposición membranales denominadas sinapsis. En estas aposiciones membranales se observa especificidad estructural, bioquímica y funcional. En el caso mas generalizado, el de la sinapsis química, en el que la funcionalidad es unidireccional, la propagación del impulso eléctrico en la membrana presináptica tiene como consecuencia la liberación de ciertos metabolitos, de los cuales algunos que se han denominado "neurotransmisores", los que difundiendo a través del espacio que sepa

-ra las membranas (espacio intersináptico), alcanzan la membrana postsináptica e interaccionan con un "sistema receptor". La interacción transmisor-receptor produce modificaciones en este sistema, siendo la más conocida y estudiada, la modificación de la permeabilidad a ciertos iones, lo que trae como consecuencia, la alteración de la diferencia de potencial a través de la membrana postsináptica.

No obstante existen también modificaciones de tipo bioquímico como resultado de esa interacción. Entre las modificaciones observadas a este respecto según el neurotransmisor y la sinapsis en juego, se encuentra la activación de las enzimas adenil y guanil ciclasas, cuyo producto, AMP y GMP cíclicos, respectivamente, pueden aumentar sus niveles de concentración como respuesta a la estimulación hormonal.

La respuesta celular, en estos casos, es un fenómeno que involucra ciertas enzimas (proteína-cinasas) que requieren para su actividad de la presencia de los nucleótidos cíclicos ya citados. Este tipo de mediación enzimática al estímulo hormonal se ha observado presente en casi todos los tejidos animales estudiados.

En esta tesis se estudia un fenómeno metabólico que es consecuencia de la actividad sináptica, cuando se produce estimulación eléctrica repetitiva en las vías aferentes a las sinapsis. El resultado metabólico es la activación de una proteína cinasa, observada a través de la fosforilación de un sustrato proteico presente en la sinapsis. Dicha estimulación de la actividad enzimática a más de ser selectiva a ciertas sinapsis, se manifiesta con una latencia temporal de varios órdenes de magnitud mayor que el tiempo involucrado en la transmisión sináptica química.

El modelo en que se estudió esta modificación es el ganglio cervical superior de la rata, por ser un sistema sináptico parcialmente aislado, que presenta en muchos aspectos organización similar a la existente en los centros nerviosos superiores, tanto estructural farmacológica, y bioquímica, como fisiológicamente.

Los resultados de este trabajo aunque preliminares abren nuevos horizontes en las interpretaciones bioquímicas de los fenómenos sinápticos.

GENERALIDADES

Entre los más recientes avances en la investigación en el campo de la bioquímica celular, se encuentran los conocimientos obtenidos en relación a la regulación de los procesos metabólicos. Esta regulación puede ser tan diversa como los mismos metabolitos, variar en función de los diferentes tipos celulares e incluso darse el caso de que un mismo mecanismo regulatorio desempeñe funciones diversas en distintos tejidos.

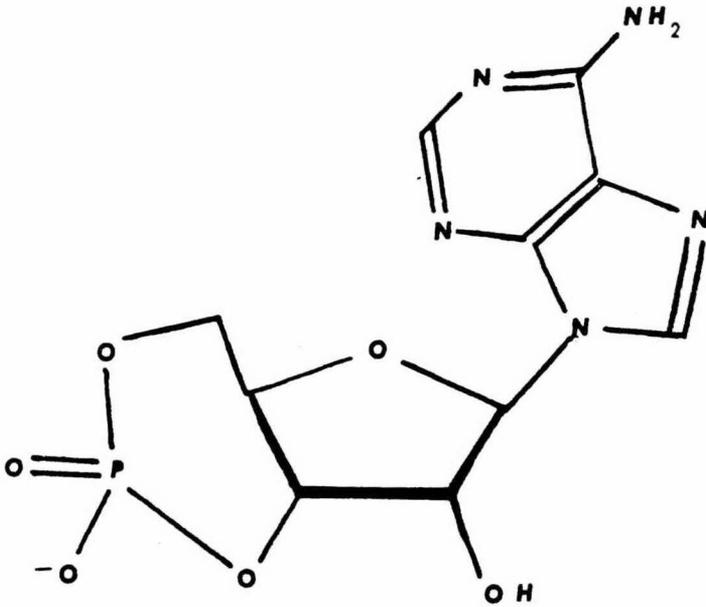
En el estudio de la regulación del metabolismo celular se ha observado que un grupo muy importante de hormonas (mensajeros extracelulares, primeros mensajeros), no penetrando en la célula tiene su acción a nivel membranal. Las hormonas que actúan en esta forma tienen como denominador común la activación de las enzimas nucleotidil-ciclasas en esas mismas membranas. Los niveles intracelulares de los nucleótidos cíclicos, producto de la acción estas enzimas son reguladas en forma complementaria por la enzima que los degrada, la fosfodiesterasa.

De los nucleótidos cíclicos, el adenosin 3',5'-monofosfato (AMP cíclico) y el guanosin 3',5'-monofosfato (GMP cíclico) (uno u otro según el sistema), son conocidos como segundos mensajeros (portadores intracelulares de la información hormonal) y modulan la actividad enzimática de los terceros mensajeros. Como tercer mensajero para el sistema del AMP cíclico hasta ahora solo se conocen las proteina-cinasas, que fosforilando proteínas específicas, que no en todos los casos han sido identificadas como enzimas, producen las respuestas fisiológicas en el interior de las células.

Las enzimas y metabolitos arriba descritos constituyen el sistema de nucleótidos cíclicos, que con un poco más de detalle se discuten a continuación, con enfoque especial al sistema del AMP cíclico (fig. 1).



FIG. 1. SISTEMA DEL AMP CICLICO



AMP cíclico

FIG. 2.

Adenosin 3',5'-Monofosfato

EL SISTEMA DEL AMP cíclico

El AMP cíclico (fig. 2) descubierto por Sutherland (Rall et al., 1957) se ha observado ampliamente distribuido en los tejidos animales (Sutherland and Rall 1960; Robison, et al., 1971) y en tejidos vegetales (Kessler and Levistein, 1974).

Su función en hígado está relacionada con el metabolismo del glucógeno (Krebs, et al., 1966), pero es sintomático que sus niveles sean más elevados en cerebro que en ningún otro órgano (Steiner, et al., 1970), donde por otra parte la función regulatoria del metabolismo del glucógeno no es tan evidente (Kakiuchi and Rall, 1968).

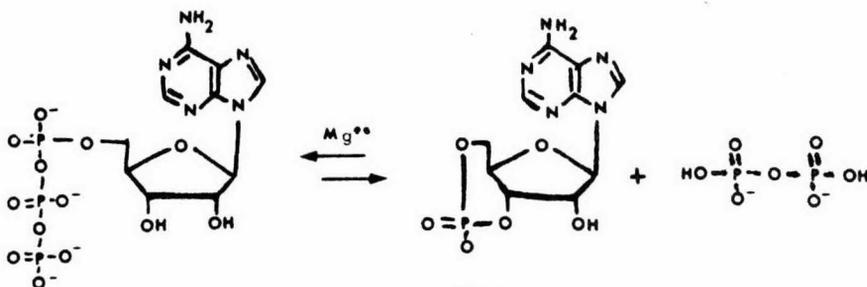
En la actualidad el AMP cíclico es reconocido como mensajero intracelular mediando la acción de gran cantidad de hormonas, lo que originó su calificativo de segundo mensajero (Sutherland and Rall, 1960; Sutherland et al., 1965; Robison et al., 1968).

En esta situación, se antoja que la formación del AMP cíclico en cerebro sea estimulada por la acción de los neurotransmisores al interaccionar con los receptores de la membrana post-sináptica, como resultado de la transmisión química.

ADENIL - CICLASA

La única vía de síntesis del AMP cíclico en el metabolismo celular es a través de la enzima denominada adenil-ciclasa, que utilizando como sustrato adenosin, 5'-trifosfato (ATP) genera el nucleótido cíclico y pirofosfato inorgánico.

Adenil - Ciclasa



Esta enzima en el sistema nervioso a semejanza de otros tejidos, se encuentra asociada a material particulado. En cerebro se encuentra principalmente en materia gris, y subcelularmente en membrana plasmática

(Robison, et al., 1968), asociada con sinaptosomas (De Robertis, et al., 1967), habiéndose descrito localizada preferentemente en la membrana postsináptica (Weis and Costa, 1968), la que conserva la actividad de adenil-ciclasa aún después de tratada con choque hiposmótico (Sutherland, et al., 1962).

Estructuralmente se considera que la enzima forma parte integral de la membrana, y está compuesta de dos subunidades: una propiamente catalítica en la parte interior de la membrana, y la otra regulatoria que puede formar parte del receptor a neurotransmisor, posiblemente en la cara exterior de la membrana.

Esta enzima no ha podido ser aislada, por su presumible asociación a la membrana y porque en los suscesivos pasos de purificación, se pierde la actividad enzimática. En general el proceso de homogeneización del tejido, parece modificar estructuras esenciales, lo que disminuye la capacidad de respuesta de la enzima al estímulo hormonal (Perkins and Moore, 1971).

Las propiedades cinéticas de la adenil-ciclasa en cerebro parecen ser similares a las de otros tejidos, requiriendo para su actividad la presencia de magnesio

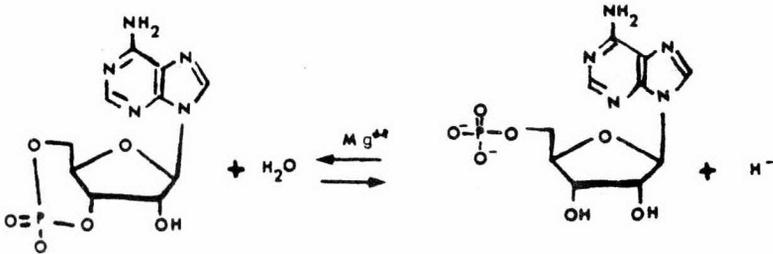
iónico, con el que forma un complejo el ATP que le permite interaccionar con el sitio activo de la enzima. También se sugiere dependencia de calcio, pues en presencia de quelantes de este ión desaparece la actividad, recuperándose al agregar pequeñas cantidades de calcio (Bradham, 1972).

La influencia de hormonas, fármacos y otros iones sobre la actividad de esta enzima en el sistema nervioso ocupa en la actualidad un campo muy amplio de la literatura especializada, por lo que no será descrita en este trabajo. Para revisiones sobre este tema consultar Drumond (1973) y Bayón, et al., (1973) entre otros. Sin embargo, es necesario citar que existen antecedentes de activación de la adenil-ciclasa en rebanadas de corteza cerebral por estimulación eléctrica, aunque la respuesta esté mediada probablemente por neurotransmisores que sean en realidad quienes estimulan dicha adenil-ciclasa (Kakiuchi, et al., 1969).

FOSFODIESTERASA

La adenosín 3',5'-fosfodiesterasa o simplemente fosfodiesterasa es la enzima que inactiva al AMP cíclico, hidrolizándolo a adenosín 5'-monofosfato, por lo que su papel es complementario a la adenil-ciclasa en la regulación de los niveles celulares de AMP cíclico.

Fosfodiesterasa



Reportada por primera vez por Sutherland y Rall (1958), se ha encontrado ampliamente distribuida en la naturaleza, pero no ha recibido la atención que la adenil-ciclasa. A semejanza de esta enzima su actividad específica es mucho mayor en sistema nervioso (Butcher and Sutherland, 1962).

Su actividad se ha observado distribuida subcelularmente tanto en forma soluble como particulada, pero

concentrada preferentemente en terminales nerviosas (De Robertis, et al., 1967). Esta actividad probablemente sea debida a más de una enzima. Su presencia en forma soluble ha sido supuesta como artefacto debido a que después de practicar choque hiposmótico a estas membranas, gran parte de la actividad posiblemente se transfiere a la forma soluble. En todo caso la actividad específica de fosfodiesterasa es 100 veces mayor que la observada para adenil ciclasa en su estado basal. La enzima requiere para su actividad la presencia de Mn^{++} ó Mg^{++} (De Robertis, et al., 1967).

Kakiuchi, et al. (1971) han separado en sepharosa 6B, dos actividades de fosfodiesterasa con diferentes requerimientos de iones y diferentes afinidades por nucleótidos cíclicos (principalmente AMP y GMP cíclicos).

No se ha demostrado ningún control hormonal sobre esta enzima, pero sí en cambio se ha demostrado en corteza cerebral de rata que la enzima es fuertemente inhibida por nucleotidil trifosfatos y pirofosfato inorgánico, lo que implica una relación de dependencia estrecha con la actividad de la adenil-ciclasa (Cheung, 1969, 1971).

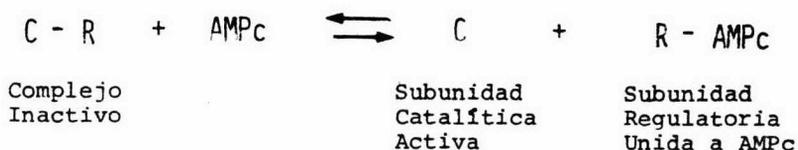
PROTEINA-CINASAS DEPENDIENTES DE NUCLEOTIDOS CICLICOS.

Las proteina-cinasas son enzimas cuya función regulatoria fue demostrada en los trabajos de Krebs y colaboradores en la glucogenólisis de músculo esquelético de conejo. En estos trabajos se observó que en el homogenado de músculo en presencia de Mg^{++} y ATP, el AMP cíclico estimulaba la fosforilación de una proteína específica que a través de una serie de reacciones en cascada logra un fino control en la síntesis y degradación del glucógeno*. A esta enzima regulatoria primera de su especie reportada, se le denominó proteina-cinasa por demostrar afinidad a casi todos los sustratos proteicos ensayados (Walsh, et al., 1968).

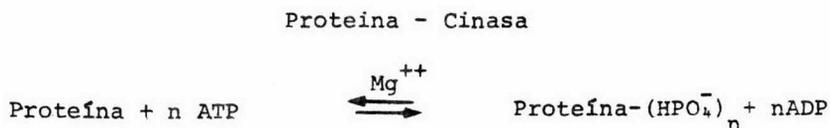
Examinando el mecanismo de regulación de la actividad de estas proteina-cinasas en su dependencia por AMP cíclico, se observó que dichas enzimas están constituidas por dos subunidades distintas, una catalítica y la otra regulatoria. Ambas subunidades constituyen una

* Para revisión sobre estos trabajos se puede consultar Krebs, 1972 y Greengard and Kuo, 1970.

holoenzima inactiva, que se disocia al ligarse en forma específica el nucleótido cíclico a la fracción regulatoria liberando la subunidad catalítica ahora activa, según la reacción:



La actividad de las proteina-cinasas consiste en la transferencia del fosfato de la posición gamma del ATP a una proteína sustrato:



Después del descubrimiento de la proteina-cinasa dependiente de AMP cíclico en la fracción soluble de músculo esquelético, se ha observado la presencia de enzimas similares en gran cantidad de tejidos animales de varios phila (Kuo and Greengard, 1969a, 1969b; Kuo

et al., 1970; Weller and Rodnight, 1970). También se ha reportado la existencia de proteina-cinasas dependientes de GMP cíclico en diversos tejidos, sobre todo en artrópodos, pero también en animales superiores y en sistema nervioso central de estos (Kuo and Greengard, 1970; Kuo et al., 1971).

Esta amplia distribución de proteina-cinasas dependientes de nucleótidos cíclicos permitió a Greengard y sus colaboradores proponer que la amplia variedad de efectos del AMP cíclico (y en su caso la del GMP cíclico) siempre se encuentra mediada por la estimulación de proteina-cinasas específicas (Teoría del tercer mensaje ro. Kuo and Greengard 1969a, 1969b; Greengard and Kuo 1970).

PROPIEDADES DE LAS PROTEINA-CINASAS DEPENDIENTES DE
AMP-cíclico EN SISTEMA NERVIOSO

Miyamoto y colaboradores (1969a, b) purificaron de cerebro de bovino una proteína-cinasa dependiente de AMP cíclico. Esta cinasa obtenida de la fracción soluble del homogenado de corteza se purificó 270 veces en una labor muy extensa que incluye precipitación, fraccionamiento por cromatografía en celulosa y enfocamiento isoeléctrico en geles. La enzima purificada por este método incrementa su actividad específica 20 veces en presencia de AMP cíclico en una concentración 5 μ M.

Sin embargo, se ha observado que la actividad de proteína-cinasa dependiente de AMP cíclico se encuentra en forma mucho más significativa asociada a material particulado con una distribución subcelular similar a la antes observada para adenil-ciclasa y fosfodiesterasa (Weller and Rodnight, 1970, 1973b; Maeno, et al., 1971).

La actividad de cinasa asociada a fracciones particuladas se encontró presente en casi todo el material homogenado de cerebro, con muy baja actividad en nucleos

y en mitocondrias purificados. La actividad mas importante de esta enzima asociada a material particulado se encontró en subfracciones de baja densidad (sinaptosomas y membranas microsomales) sin desprenderse de estas aún después de tratamiento en soluciones de alta fuerza iónica ó por congelamiento (Maeno, et al., 1971).

SUBSTRATO DE PROTEINA-CINASAS DEPENDIENTES DE AMP cíclico
EN SISTEMA NERVIOSO

La identificación del sustrato de las proteina-cinasas puede contribuir en forma muy importante al conocimiento del mecanismo de acción del AMP cíclico en cerebro, puesto que en dicho tejido la actividad de proteina-cinasa es alta y como se mencionó, no existe en forma significativa la regulación del metabolismo del glucógeno. Así encontrándose el sistema de AMP cíclico en cerebro asociado casi en su totalidad a membranas sinápticas, es de esperarse que desempeñe alguna otra función, relacionada con estas estructuras.

Las proteina-cinasas han sido tratadas de inespecíficas por ser efectivas en la fosforilación de gran parte de las proteínas exógenas ensayadas, lo que ha conducido a resultados confusos. En los ensayos de las proteina-cinasas sobre proteínas exógenas se ha observado que los mejores sustratos son histonas, mezcla de histonas, caseína y protamina, esto es proteínas básicas (Miyamoto, et al., 1969b, 1971; Kuo et al., 1970; Weller and Rodnight, 1970).

Por su afinidad a las histonas, se pretendió que fueran estas el sustrato intracelular de las proteínas pero en la célula las histonas se encuentran localizadas en el interior del núcleo, alejadas de las cinnasas, lo que ha inducido a buscar otro tipo de sustratos naturales.

El primer trabajo que estudia la presencia de un sustrato endógeno fosforilado por la acción de proteínas dependientes de AMP cíclico en cerebro lo realizaron Weller y Rodnight (1970), encontrando que el sustrato endógeno es capaz de aceptar la fosforilación tan eficientemente como los sustratos exógenos ensayados. Para estudiar el grupo aceptor de la fosforilación practican la hidrólisis de las proteínas fosforiladas, de donde obtienen como resultado final incorporación principalmente a serina de las proteínas fosforiladas estudiadas (Trevor and Rodnight, 1965; Jones and Rodnight, 1971). Mas recientemente se ha analizado la capacidad de cada una de las fracciones subcelulares de cerebro, para servir como sustrato de estas cinasas y se ha observado un marcado paralelismo de la distribución del sustrato protéico con la distribución de las proteínas-cinasas. En el análisis de la capacidad de

transferir el fosfato de la posición γ del ATP a proteínas endógenas por estimulación con AMP cíclico, resulta que el 70% de los aceptores fueron residuos serina y 11% residuos treonina (Johnson, et al., 1971, 1972).

En un trabajo reciente, Ueda, et al. (1973) utilizando fosfato radiactivo han intentado aislar las proteínas substratos que han sido fosforiladas. Disolviendo dichas proteínas membranales en detergentes para luego separarlas en geles de acrilamida, e identificarlas por autoradiografía. Por este método dichos autores obtuvieron incorporación de marca en dos bandas proteicas de pesos moleculares 86,000 y 46,000. En ambos casos la fosforilación se efectúa principalmente en los hidroxilos de los residuos de serina constituyentes de las cadenas peptídicas de las proteínas.

Weller y Rodnight (1971) demuestran en un sistema membranal libre de células, que existe un recambio lento del fosfato unido a proteínas de terminales nerviosas como consecuencia de la actividad de proteína-cinasa y proteína fosfatasa. Las proteínas sustrato tienen un porcentaje de grupos hidroxilo libres de fosforilación en este equilibrio de actividades enzimáticas.

Para estudiar el estado basal de fosforilación de las fosfoproteínas membranales, Weller y Rodnight (1973a), confrontan la actividad de proteína-cinasa en sinaptosomas (sin estimulación con nucleótidos cíclicos), comparando este valor con la presencia de fosfato en proteínas cuando dichas cinasas son inhibidas con sales de cobre. La diferencia de los valores observados demuestran un decremento del 12% del fósforo total unido a proteínas cuando se inhibe la acción de las cinasas.

FOSFOPROTEINA - FOSFATASAS EN SISTEMA NERVIOSO

En todos los casos observados en los diferentes tejidos animales la presencia de proteina-cinasas dependientes de AMP cíclico se encuentra acompañada por enzimas cuya acción es la hidrólisis de grupos fosfato de las proteínas.

También en sistema nervioso se ha observado esta actividad de fosfoproteína fosfatasa cuya función aparente es restituir a su condición basal a las proteínas fosforiladas por las proteina-cinasas.

Proteína - Fosfatasa



La actividad de esta enzima es de esperarse importante en la regulación de la magnitud y duración del efecto del AMP cíclico.

Se ha observado que en corteza cerebral de rata a diferencia de otros tejidos examinados, la actividad

específica de esta enzima subcelularmente se distribuye en más de 50% asociada a material particulado, especialmente a fracción mitocondrial cruda. Al subdividir esta fracción en gradientes de sacarosa, la actividad se muestra concentrada en fracciones ricas en membranas sinápticas y baja en material mitocondrial (Maeno and Greengard, 1972).

La actividad de fosfatasa presente en forma soluble es debida a varias formas de esta enzima mientras que al parecer la asociada a membranas se debe a una sola enzima. Cada una de estas actividades de la fracción particulada y de la fracción soluble han demostrado diferente afinidad por sustratos exógenos. Para la enzima asociada a material particulado el sustrato endógeno fue el mejor de los ensayos (Maeno and Greengard, 1972).

La enzima asociada a membranas tiene especificidad por las uniones ester de los residuos fosfoserina. Requiere magnesio para su funcionamiento y aparentemente no existe regulación en su actividad, aunque se ha reportado sensibilidad a bajas concentraciones de sodio, potasio y algunos nucleótidos (Weller and Rodnight, 1971).

GANGLIO CERVICAL SUPERIOR

1. Localización y Dimensiones.

El ganglio cervical superior (GCS) es el mayor de la cadena ganglionar que constituye el tronco costal, pertenece al sistema simpático del sistema nervioso autónomo. Es probablemente el mayor centro de relevos sinápticos en el sistema nervioso periférico.

En la rata este ganglio se encuentra localizado en la cara interna de la carótida, inmediatamente adelante de la bifurcación de la arteria, a nivel de la segunda y tercera vertebrae cervicales. Se extiende a lo largo de la carótida interna en la cara interna y dorsal de esta, junto a los músculos paravertebrales e inmediatamente posterior al ganglio del vago del que se puede distinguir fácilmente por carecer este último de ramificaciones y por ser su fibra aferente de mayor diámetro.

Las dimensiones del GCS pueden variar mucho de un individuo a otro, y aún de un lado al contralateral del mismo individuo, pero en general mide de dos a cuatro milímetros de longitud y alrededor de un milímetro de

diámetro. Su peso es de poco menos de un miligramo sin incluir su capsula envolvente. Su forma es lobular con un adelgazamiento en la parte media, lo que en algunos casos puede degenerar en una separación originando un ganglio intermedio entre el cervical superior y el ganglio estrellado.

Es interesante hacer notar que todas las fibras que llegan al GCS presentan relevos sinápticos (condición no generalizada a todos los ganglios nerviosos).

2. Fibras Aferentes

El ganglio cervical superior recibe fibras aferentes principalmente del tronco simpático. Esta es una vía sumamente fina (aproximadamente de unos 0.08 milímetros de diámetro), que se une al ganglio en su polo caudal. Las fibras que llegan al ganglio por esta vía provienen del ganglio estrellado (cervical medio), donde pueden o no hacer relevos sinápticos. La longitud de esta vía es de unos 20 milímetros, y en su transcurso se encuentra incluida en un paquete neuro-vascular que contiene a la carótida primitiva y al nervio vago.

3. Fibras Eferentes

Las vías eferentes mas importantes del GCS son: en su tercio caudal, la rama comunicante cervical y el nervio cardíaco superior. En su tercio medio, la ramificación que acompaña a la carótida externa, esta vía un milímetro después de su salida se subdivide y forma un intrincado plexo con la arteria que acompaña, esta ramificación es la de mayor diámetro de las eferentes de GCS de la rata. En su tercio rostral este ganglio presenta dos ramificaciones, una de ellas inmediatamente anastomosa lateralmente con el ganglio del vago y la otra que sale del polo rostral sigue a la carótida interna penetrando junto con ella a la caja craneana. Las fibras eferentes de GCS estan constituidas por los axones de las neuronas ganglionares.

4. Funciones Regulatorias

Las funciones de GCS son muy diversas y ampliamente estudiadas en la fisiología humana, pero en la rata es poca la información que existe aunque ciertas respuestas son muy utilizadas en estudios fisiológicos,

por lo que me limitaré a presentar los aspectos más generales y en forma por demás superficial.

Entre las funciones modulares que tienen las fibras eferentes del ganglio están:

- control motor sobre el flujo sanguíneo de cerebro, cara y cuello, produciendo vasoconstricción en dichas regiones.
- control pilomotor y sudomotor en cabeza, cara y cuello, produciendo contracción en músculos pilomotores y secreción en glándulas sudoríparas.
- control sobre el ritmo cardíaco incrementándolo.
- control en el ojo sobre el diámetro de la pupila, inervando los músculos radiales del iris en los que provoca contracción (midriasis), además inerva los músculos orbital, tarsal y ciliar, modificando la profundidad de visión.
- control sobre glándula lacrimal y glándulas nasales en las que provoca constricción, además en glándulas salivales: submandibular, sublingual y parotídea, provoca salivación viscosa.

La información anatómica y funcional ha sido obtenida de las experiencias en laboratorio y de las siguientes fuentes: a) Luco (1974) b) Dunant (1967) c) Volle 1972 d) Patton (1966).

PARTE EXPERIMENTAL

MATERIAL Y METODOS

1. Material Biológico y Anestesia.

El material biológico se obtuvo de ratas hembras albinas (Porton - Winstar) seleccionadas de un peso entre 230 y 260 gramos a las que se anestesió por inyección intraperitoneal de solución de nembutal sódico (30 mg/Kg). Con esta dosis se logra que las ratas permanezcan anestesiadas aproximadamente 3 horas, siendo la acción depresora ganglionar despreciable (Exley, 1954).

2. Disección

Después de anestesiada la rata y sujeta a una mesa de disección, donde se le practica una incisión en la cara ventral del cuello hasta la cabeza del esternón, procurando que el corte no llegue a lastimar los músculos superficiales. Una vez separada y sostenida la

piel por medio de tensores, se procede a seccionar los músculos esternomastoideo y esternoiideo, oblicuos y rectos del cuello, con lo cual queda expuesta la traquea que se secciona y se coloca en forma que permita la fácil respiración del animal. A continuación se liga y se corta el esófago, se seccionan los músculos profundos hasta la total exposición de la arteria carótida, desde su salida de la caja torácica hasta su penetración por el agujero razgado.

En esta forma queda espuesto el paquete neurovascular conteniendo la carótida, nervio vago y ganglio nodoso así como tronco y ganglio simpáticos. Con esta exposición, el GCS queda en el seno de la bifurcación de la carótida, de donde sube adosado a la ramificación arterial interna (fig. 3).

3. Metodología

a) Electroestimulación in vivo

Para los ensayos in vivo una vez expuesto el paquete neurovascular y manteniendo intacta la irrigación



Fig. 3. Exposición de paquetes neurovasculares.



Fig. 4. Presentación de la fibra preganglionar.

sanguínea, se disecciona una parte del tronco simpático en su porción más próxima al ganglio estrellado (fig. 4) donde se secciona para evitar influencias del sistema nervioso central. Así aislado el tronco, se colocan los electrodos de estimulación procurando que estos hagan contacto con el tronco simpático y se mantengan aislados del resto del paquete neurovascular y de tejido muscular con algodones empapados en nujol.

Los electrodos de registro para estudio de la respuesta preganglionar se colocan en el tronco en la region proximal al GCS en condiciones similares de aislamiento (fig.5). En el caso de registro postganglionar este se obtiene de la rama nerviosa eferente que acompaña a la carótida externa.

b) Incubación y Electroestimulación in vitro

En los ensayos in vitro se procede a diseccionar el ganglio en la siguiente forma: se seccionan en primer término las fibras postganglionares, procurando obtener la mayor longitud de ellas, después se desprende el ganglio con cuidado evitando lesionarlo, retirándolo de la carótida y por último se separa el tronco preganglionar

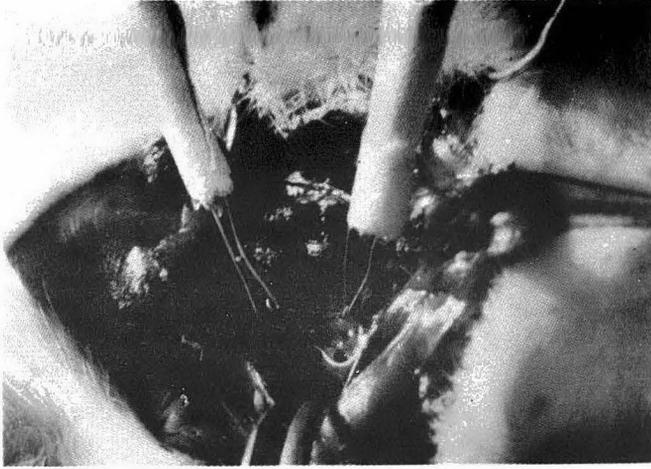


Fig. 5. Colocación de electrodos para registro de conducción en tronco simpático.

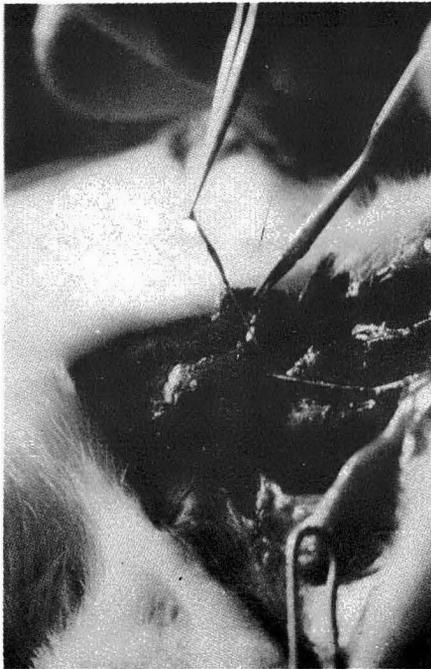


Fig. 6. Escisión del Ganglio Cervical Superior.

desgarrando la envoltura del paquete neurovascular en sentido céfalo-caudal y seccionando el tronco simpático (fig. 6).

Una vez aislado el ganglio con sus fibras pre y postganglionares se procede al descapsulamiento del mismo bajo microscopio de disección en la solución de incubación que se describirá mas adelante. La cápsula envolvente del GCS está constituida por tejido conjuntivo y es necesario retirarla para facilitar el intercambio de metabolitos entre el ganglio y la solución de incubación.

Para llevar a cabo el descapsulamiento (fig. 7) se sostiene el ganglio con sumo cuidado por la ramificación de la carótida externa en su extremo mas distal, sin sujetar la cápsula, mientras con un micro estilete en forma de garfio se engancha la cápsula y se retira deslizándola suavemente por la superficie del ganglio, en dirección caudal hasta desnudar de la cápsula al tronco preganglionar.

Es necesario que la región de la rama postganglionar que quedó en contacto con las pinzas en el descapsulamiento sea pequeña, permitiendo obtener

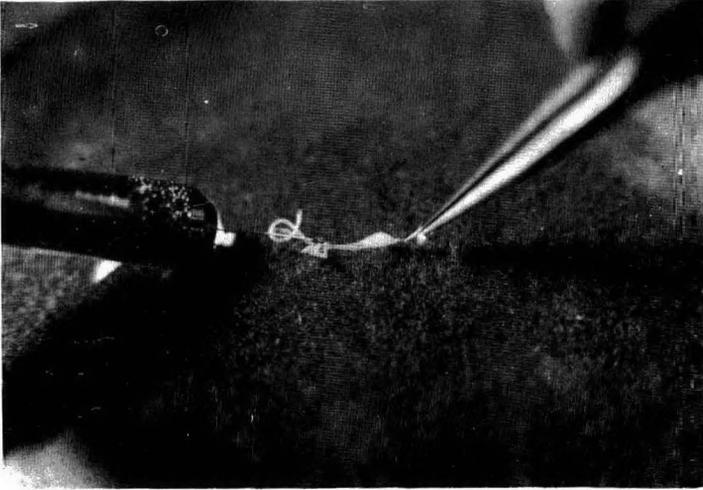


Fig. 7. Descapsulamiento del Ganglio Cervical Superior para estudios in vitro.

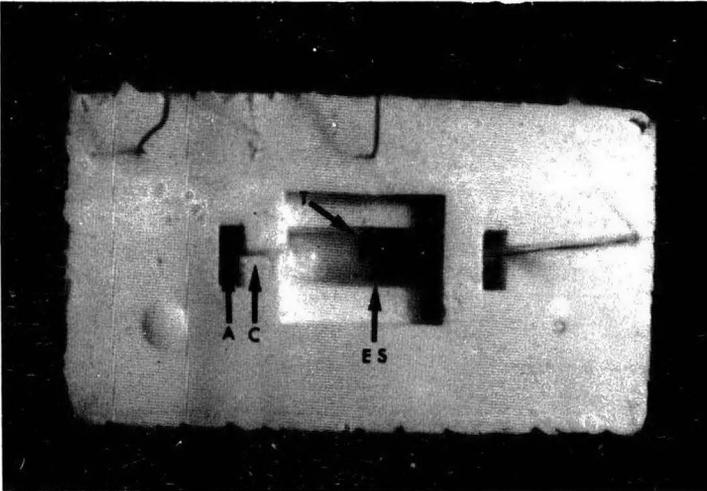


Fig. 8. Cámaras de incubación mostrando electrodos de estimulación (A, ánodo C cátodo), registro (ES electrodo de succión) y tierra (T).

ilesa una región suficiente para obtener registros tran
sinápticos de esa fibra.

La operación de descapsulamiento se realiza en la solución de incubación que se mantiene a temperatura am
biente y saturada por burbujeo con una mezcla de oxígeno 95% y bióxido de carbono 5%. Este descapsulamiento no debe tomar más de 15 segundos.

La solución en que se descapsulan y se mantienen los ganglios en las cámaras de incubación es similar a la utilizada por Banks (1970). Su composición milimolar es:

	mM
NaCl	136.0
KCl	5.6
NaHCO ₃	16.1
NaH ₂ PO ₄	5.0
MgCl ₂	1.2
CaCl ₂	2.2
Glucosa	5.5

Una solución similar libre de fosfatos se utiliza cuando la incubación se hace con fosfato marcado

(³²P), el cual se agrega posteriormente en la cámara al iniciar la incubación.

4. Cámaras de Incubación y Electrodo

Los trabajos en el modelo de GCS se pretendieron hacer inicialmente con cámaras de incubación reportadas con anterioridad en estudios fisiológicos (Banks, 1970; García Ramos, 1973) pero en aquellos trabajos los fines eran distintos. En ellos se trabaja con un solo ganglio, no se utilizan isótopos marcados, etc. Al utilizarse isótopos radioactivos es necesario reducir al mínimo el volumen de la solución por razones de seguridad y para obtener una actividad específica elevada.

Para la realización de los estudios del GCS in vitro se diseñó un equipo que se apega a las necesidades de la experimentación. Dicho equipo consiste de cámaras de incubación con electrodos de plata fijos, aditamentos de control de temperatura y flujo de oxígeno, y un circuito semiautomático de estimulación eléctrica para cada una de las cámaras.

Las cámaras de incubación individuales se fabrica-

-ron a partir de moldes de aluminio en los que se vació material plástico de silicón biológicamente inerte (Silastic RTV-E, Dow Corning). A dicho material se varió la consistencia hasta lograr que después de la polimerización catalizada, presentara suavidad suficiente para poder sujetar al GCS por su vía presináptica sin causarle lesión o impedir su conducción, permitiendo un contacto directo de la fibra con los electrodos de estimulación y evitando también la formación de puente salino entre los electrodos, lo que reduciría significativamente la eficiencia de estimulación.

El objeto de dichas cámaras es además de fijar el ganglio en contacto con los electrodos, mantenerlo sumergido en un volumen de solución controlado. Con éste equipo la estimulación y registro eléctricos, se pueden llevar a cabo sin necesidad de volver a manipular el ganglio después de su colocación inicial.

Cada cámara (fig. 8) consta de dos pozas, una, la poza principal con una capacidad de 250 μ l donde se coloca la solución de incubación y otra mas pequeña, separada de la primera por una pared de Silastic de unos dos milímetros. Las cámaras estan unidas por una ranura que se

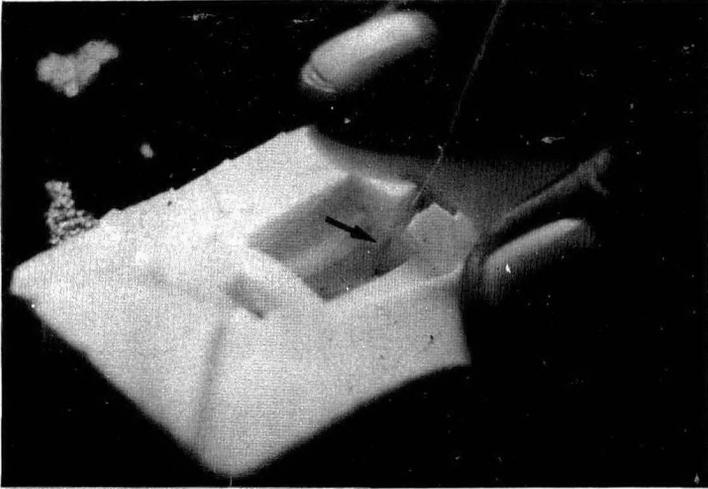


Fig. 9. Colocación del Ganglio Cervical Superior para estudios in vitro.

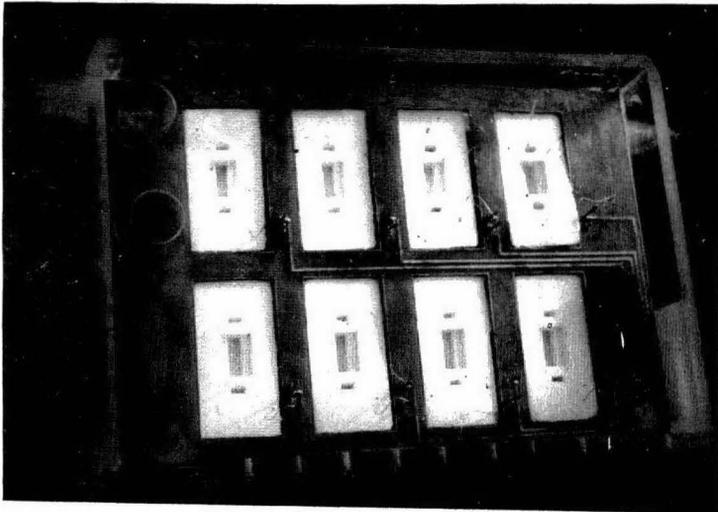


Fig. 10. Disposición de las cámaras en el baño de incubación.

abre para colocar la fibra preganglionar (fig. 9) cuyo extremo distal al ganglio queda en la poza menor, en la que se encuentra uno de los electrodos de estimulación (ánodo), que hace contacto con la fibra a través de solución salina. El otro electrodo (cátodo), se encuentra localizado en la parte media de la ranura, haciendo contacto directo con la fibra. Al cerrarse la ranura, la pared de silicón excluye toda la solución salina evitando la formación de puente salino entre los electrodos o entre las pozas.

En el seno de la poza principal existe un electrodo indiferente o "tierra" común para estimulación y registro. Todos los electrodos penetran en el material plástico de silicón viniendo de sus puntos de conexión al circuito de estimulación descrito mas adelante.

Para obtener los registros transinápticos in vitro, se preparó un electrodo de succión con tubo de polietileno (Intramedic Tubing cal. .015") permitiendo solamente la entrada a la fibra postganglionar, hasta sellar el paso del tubo con el cuerpo del ganglio. En el interior de este ducto se encuentra un electrodo, que hace contacto con el ganglio a través de solución salina, aislado del electrodo indiferente que funciona como "tierra" en la poza principal.

5. Control de Oxigenación y Temperatura

La oxigenación, se regula exterior e individualmente para cada cámara de incubación en un baño que con capacidad para 8 cámaras que permite incubar simultáneamente 8 ganglios en forma individual (fig. 10). La conducción de la mezcla gaseosa se hace a través de un tubo de polietileno (Intramedic Tubing cal. .011") desde el tambor de compensación de presión, donde se encuentran las válvulas de regulación de flujo, hasta la parte inferior de la poza mayor (fig. 10).

El control de temperatura se logra a través de un depósito de agua que baña la parte exterior de las cámaras. Este depósito se mantiene a la temperatura deseada por un serpentín de recirculación de agua caliente, obteniéndose un control de temperatura en las cámaras de $37^{\circ}\text{C} \pm 0.5^{\circ}\text{C}$. La variación de temperatura se monitorea por medio de un termopar conectado a un teletermómetro fabricado en el mismo C.I.E.A. en el departamento de Ingeniería Eléctrica (fig. 11).

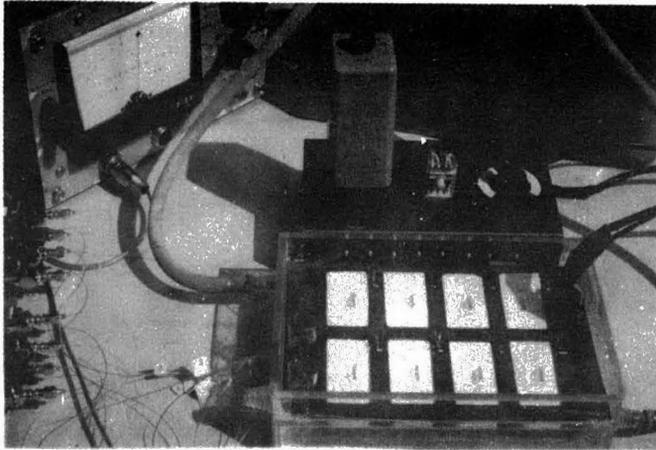


Fig. 11. Detalle del equipo de regulación de oxigenación, temperatura y duración de trenes de estimulación.

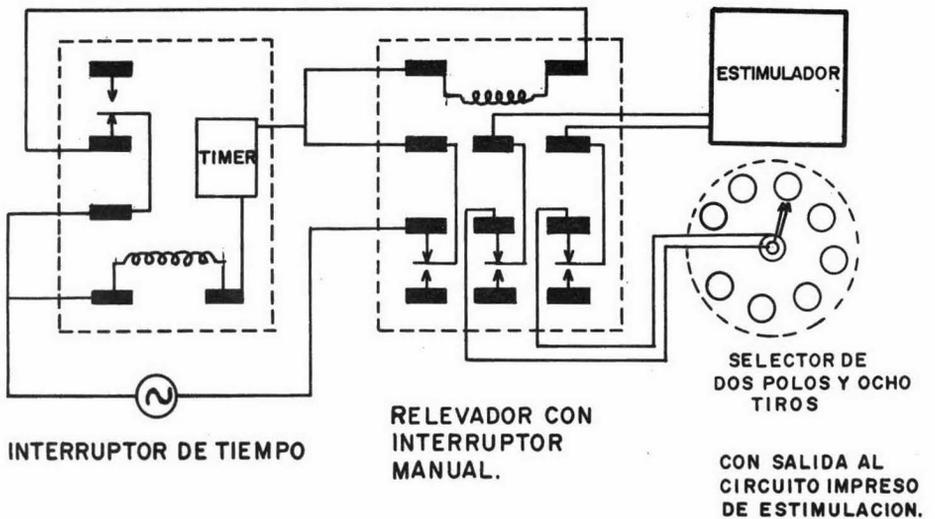


Fig. 12. Diagrama del regulador semiautomático de trenes de estímulo.

6. Dispositivos de Estimulación y Registro

La estimulación se hace con un generador de pulsos rectangulares con controles para variar la duración, frecuencia e intensidad de dichos pulsos (Stimulator Model 588 Grass Instruments Co.). Este generador está conectado a un dispositivo electrónico diseñado y construido en nuestro laboratorio. Consta de dos relevadores, un interruptor de tiempo variable, un selector múltiple y un disparador manual (diagrama fig. 12). Este dispositivo permite regular la duración de cada tren de estímulos así como seleccionar cada una de las cámaras de estimulación a través de un circuito impreso, al que están conectados los electrodos de estimulación.

Cuando se trabajó in situ la estimulación se disparó en forma manual a través de una unidad de aislamiento de estímulo (Grass Model SIU 4 B), y se usaron electrodos en forma de gancho, que hacen contacto fácilmente con el tronco simpático, mientras el resto de tejido permanece aislado con algodones empapados en nujol.

El registro in situ se practicó con electrodos similares a los de estimulación, mientras que in vitro se utilizó el electrodo de succión antes descrito. En los

casos que se practicó el registro electrofisiológico, tanto de la fibra como del ganglio se optó por no utilizar la unidad electrónica de regulación de duración de trenes de estímulo, por interferir los relevadores electromagnéticamente con la señal en el equipo de registro.

La señal obtenida en los electrodos, se amplifica en un preamplificador y un amplificador acoplados por capacidad (Grass Model P9 AC) y luego es conducida a un osciloscopio de rayos catódicos (Tektronix tipo RM 502) de donde se pueden registrar fotográficamente (figs. 13 y 14).

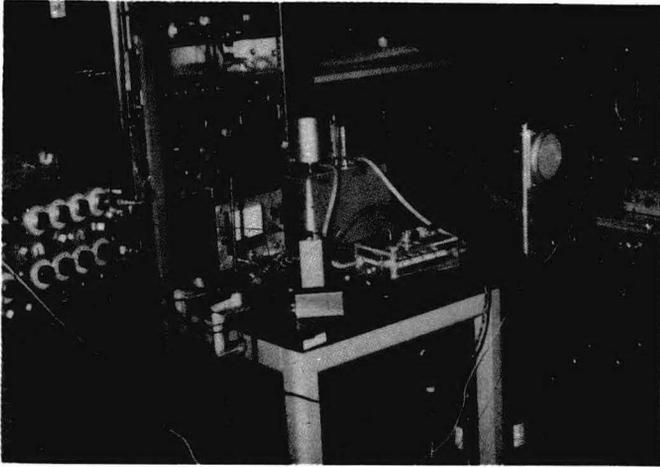


Fig. 13. Equipo electrofisiológico para trabajo in vivo.

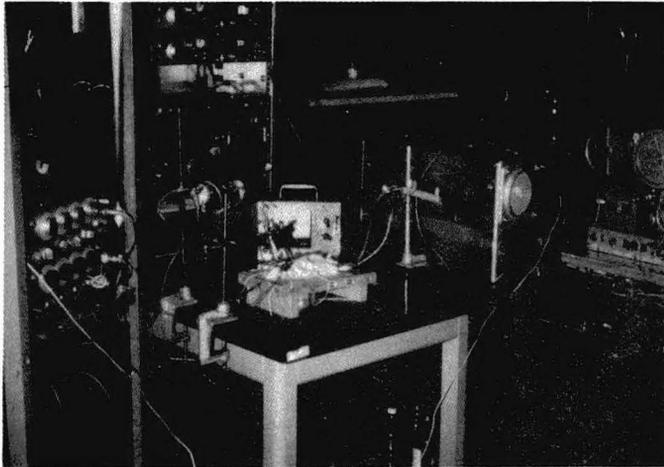


Fig. 14. Equipo electrofisiológico para trabajo in vitro.

ENSAYO ELECTROFISIOLÓGICO

1. Propiedades de Conducción de la Fibra Preganglionar.

Con los electrodos colocados en la forma anteriormente descrita para estimulación y registro de la fibra preganglionar in situ, se analizó la capacidad de conducción de la fibra en dos aspectos:

- primero.- se procedió a determinar el umbral de intensidad a que es capaz de responder la fibra si se le aplica un estímulo único. Se hicieron observaciones con estímulos de diferente duración en el rango de 0.01 a 10 milisegundos.

- segundo.- se estudió en forma similar en el mismo rango de tiempo el voltaje mínimo necesario en cada caso para obtener una respuesta máxima conducida por la fibra.

2. Respuesta Transganglionar

La obtención de la respuesta transináptica es muy

difícil de observar con estímulos únicos en registros extracelulares con electrodos de campo (como en el presente caso), aún si se produce un choque de intensidad supramáxima. Esta deficiencia se remedia parcialmente si el choque único a observar, es precedido de un tren de estímulos, propiciando la potenciación de la respuesta.

Para las determinaciones bioquímicas descritas mas adelante se utilizaron las siguientes condiciones de estimulación: se aplicaron choques con una frecuencia de 40 Hertz teniendo, cada pulso una duración de 20 milisegundos, e intensidad de 4 voltios. La duración del tren de pulsos es de 20 segundos. Estas condiciones ofrecen buena respuesta transináptica en los ensayos fisiológicos. Sin embargo, no fue posible practicar registros fisiológicos de todos los ensayos bioquímicos.

3. Condiciones Metabólicas y Funcionales del GCS in vitro.

El GCS ha sido ampliamente estudiado en sus requerimientos metabólicos así como sus respuestas electrofisiológicas in vitro (Larrabe and Bronk, 1952; Dunant,

1967; Bank 1970 entre otros). Esto se debe en parte a que es un sistema fácil de aislar y que permite la observación de la actividad eléctrica in vitro.

Larrabee y Bronk (1952) observaron que el ganglio conservado en condiciones apropiadas in vitro, continúa respondiendo a estímulos eléctricos por períodos prolongados. En dicho estudio se compara el decaimiento de la respuesta del ganglio a la estimulación in vitro con el decaimiento observado cuando el ganglio solamente es seccionado en el tronco simpático, mantenido en el animal sin mas alteración y así estimulado. En ambos casos el decaimiento de la respuesta es similar; esto es, la respuesta decae a la mitad de su amplitud 24 horas después de su disección ya sea si solo se secciona el tronco o si se mantiene el ganglio in vitro en condiciones favorables de oxigenación, temperatura y en solución Ringer con glucosa. Lo que hace suponer que el decaimiento en la respuesta se deba principalmente a degeneración de las fibras aferentes.

Para corroborar estas observaciones se estudió en nuestro laboratorio la respuesta a la estimulación eléctrica en el GCS por períodos de tiempo mas breves pero

suficientes para el desarrollo de todos los experimentos subsecuentes. Se hicieron observaciones por periodos de 120 minutos sin que el curso de este tiempo existiera un decaimiento significativo.

Paralelamente se estudió la influencia de la estimulación que se usaría rutinariamente esto es, la aplicación de un tren con frecuencia de 40 Hertz, cada pulso con una duración de 20 milisegundos de 4 volts aplicados durante 20 segundos. De las respuestas se obtuvieron registros cada 5 minutos durante 120 minutos. No se observaron variaciones significativas con respecto a los registros control.

ENSAYO BIOQUIMICO

1. Fraccionamiento Subcelular del Ganglio

Para lograr el fraccionamiento subcelular del ganglio se utilizó la técnica de De Robertis, et al. (1962) que se modificó adaptándola a microescala.

Para cada determinación se utilizaron grupos de 5 ganglios (peso total de 4.5 - 5.0 mg de tejido húmedo), los que se cortan con tijeras castroviejo, bajo microscopio de disección en solución buffer de fosfatos 1 mM pH 7.4, en baño de hielo, obteniendo de cada ganglio diez trozos aproximadamente. Este y todos los pasos sucesivos se llevan a cabo en cuarto frío en baño de hielo manteniendo una temperatura máxima de 4°C.

El material así seccionado se transfiere a un micro homogenizador de vidrio (fabricado con tubo de precisión Ace Glass Co.) con capacidad de 600 µl. En el homogenizador se le agrega solución sacarosa 0.32 M en buffer de fosfatos 1mM pH 7 hasta un volumen de 500 µl. En seguida homogeniza el material con un pistón de ace-

-ro inoxidable, con una luz entre las paredes del pistón y las del homogenizador de 8 milésimas de pulgada. Para esta operación el pistón se hace girar a una velocidad de 700 rpm con tres movimientos de descenso y ascenso.

El homogenado obtenido se transfiere a microtubos Kimax (500 μ l) para centrifugarlo a 1,500 rpm (1,200 g) durante diez minutos, lo que permite sedimentar núcleos celulares y partículas macroscópicas. A la fracción así sedimentada se le denominará "fracción nuclear". Esta fracción es controlada por microscopía óptica de contraste de fases para constatar la presencia de núcleos celulares íntegros.

El material sobrenadante de esta primera centrifugación se transfiere a tubos limpios para ser centrifugado a 13,000 rpm (17,500 g) durante 15 minutos. El sedimento resultante de esta operación se le llamará "fracción mitocondrial cruda" y al sobrenadante "fracción soluble".

Dependiendo del ensayo, de esta "fracción soluble", se pueden precipitar proteínas si se agrega un volumen igual, de una solución ácido tricloroacético (TCA) al

10%, manteniendo la mezcla en hielo durante una hora, para centrifugarlo nuevamente en condiciones similares a las anteriores. En este caso el precipitado se denominará fracción proteica precipitada con TCA".

Por otra parte la "fracción mitocondrial cruda" se resuspende en 100 μ l de solución isotónica de sacarosa (0.32 M) libre de otros iones, centrifugándola nuevamente a 13,000 rpm durante 15 minutos, desechando el material sobrenadante de esta operación. Este paso tiene por objeto reducir la contaminación de la "fracción mitocondrial cruda" con la "fracción soluble".

La "fracción mitocondrial cruda" lavada se resuspende con la ayuda de un Vortex en 50 μ l de solución isotónica de sacarosa para ser colocada con sumo cuidado en la parte superior de un gradiente discontinuo de sacarosa previamente preparado en un tubo de nitrato de celulosa para ultracentrífuga (Beckman 305528, 3/6" x 1 21/32" con capacidad de 650 μ l).

El gradiente de sacarosa esta constituido de la parte inferior a la superior por las siguientes soluciones: sacarosa 1.40 M, 180 μ l; sacarosa 1.20 M, 180 μ l; y sacarosa 1.00 M, 200 μ l. Este gradiente debe ser pre

-parado con las soluciones frías poco tiempo antes de su uso, para evitar hasta donde sea posible la difusión entre las diferentes soluciones.

Una vez aplicada la muestra por fraccionar en la parte superior del gradiente se procede a la centrifugación en un cabezal de columpio tipo SW41 (Beckman) en ultracentrífuga con refrigeración (Spinco L2-65 B) a una velocidad de 23,000 rpm (40,000 g) un mínimo de tiempo de 180 minutos.

El resultado de esta operación es la obtención de 4 bandas de partículas de diferente densidad distribuidas en las interfases del gradiente discontinuo de sacrosa, las que De Robertis, designa con las letras A,B, C,D y E en orden descendiente identificándolas como: fracción A; mielina y membranas somáticas; fracción B, fantasmas celulares; fracción C, "sinaptosomas colinérgicos"; fracción D, "sinaptosomas no colinérgicos"; fracción E, o sea precipitado en forma de pastilla, mitocondrias (De Robertis, et al., 1962).

Las diferentes fracciones así obtenidas son separadas manualmente, transferidas a tubos, diluidas con sacarosa 0.05 M hasta isotonicidad y centrifugadas a

13,000 rpm para obtenerlas en forma compacta, descartando el sobrenadante.

Para los ensayos sucesivos, a excepción de la preparación de las muestras para microscopía electrónica cuya técnica se describe mas adelante, las muestras de proteínas particuladas y en su caso la "fracción proteica precipitada con TCA" de la "fracción soluble", se disuelven cada una separadamente en 60 μ l de NaOH 0.1N. El volumen resultante se distribuyó en la siguiente forma: de cada muestra dos alícuotas de 20 μ l se utilizaron para determinar incorporación de isótopo radioactivo a proteína, y dos alícuotas de 10 μ l se utilizaron para determinar cuantitativamente el contenido de proteínas. La cantidad total de proteína en cada fracción es aproximadamente 1 μ g.

Todas las determinaciones se refirieron a concentración de proteína cuantificada por el método de Lowry, et al. (1951) en micro escala.

2. Preparación de Muestras para Microscopia Electrónica.

Muestras de las subfracciones celulares resultan-

-tes del fraccionamiento en gradientes discontinuos de sacarosa se prepararon de la siguiente manera para su observación en microscopía electrónica*: las pastillas obtenidas de las fracciones C y D se fijaron a temperatura ambiente en buffer de cacodilato 0.1 M conteniendo 2.5% de glutaraldehído, en esta solución permanecieron las muestras durante 15 minutos. A continuación se procede a su deshidratación gradual en soluciones alcohólicas al 70, 90 y 100% por 20 minutos en cada una. En alcohol absoluto se hacen 3 lavados después de lo cual se ponen en presencia de un deshidratante fuerte (óxido de propileno) dos veces durante 20 minutos cada vez.

Las muestras así tratadas son preincluidas en resina epoxi (Epon 912) y óxido de propileno 1:1, e incluidas posteriormente en Epon 812 a 60°C durante 24 horas.

Una vez incluidas las muestras se cortan en ultramicrotomo (Portren, Bloom MT1), se recogen en rejillas de cobre de 200 mallas, cubiertas con película (FORM-VAR),

* Este ensayo lo llevó a cabo la Srita. Viviana Chávez en el laboratorio de Microscopía Electrónica del C.I.E.A., a cargo y bajo la dirección del Dr. Adolfo Martínez Palomo.

para ser teñidas con acetato de uranilo (20 minutos) y citrato de plomo (20 minutos).

Las muestras tratadas en esta forma se observaron en un microscopio electrónico Zeiss ME9 de donde se obtuvieron registros fotográficos.

3. Determinación de (^{32}P)-Fosfato Incorporado a Proteínas.

De las muestras disueltas en NaOH 0.1N se tomaron alicuotas de 20 μl que se colocan por duplicado, por se parado en discos de papel para cromatografía (3MM Whatmann) y se secan con aire caliente. Una vez secos los discos se procede con una modificación de la técnica de Mans y Novelly (1961) en la siguiente forma.

Los discos se lavan por un mínimo de dos horas en un matraz en baño de hielo, con una solución de TCA al 10% y fosfato de sodio 50 mM, utilizando 6 ml de solución por disco, después de lo cual se hacen tres cambios de 15 minutos cada uno en solución de composición similar; después 30 minutos en etanol:eter (1:1) a 37°C; 15 minutos en etanol:eter (1:1) a temperatura am

-biente; 2 cambios de 15 minutos en eter a temperatura ambiente. Los discos se secan individualmente con aire caliente y se cuentan en viales con 10 ml de solución de centelleo (0.5% PPO, 0.03% dimetil POPOP en tolueno grado espectrofotométrico Packard) en un contador de centelleo líquido (Packard Model Tricarb 557).

4. Electroforesis en Geles de Acrilamida

La electroforesis se corrió en láminas de geles de acrilamida lo que permite aplicar varias muestras en un mismo gel, para una fácil comparación de los diferentes patrones protéicos provenientes de varias muestras.

La técnica esta basada principalmente en las de Shapiro, et al. (1967) y Weber and Osborn (1969). La acrilamida y la bisacrilamida (N,N'metilen bisacrilamida Eastman Organic Chemicals) se purifica previamente con el método utilizado por Loening (1967). Para la obtención de los geles de acrilamida se preparan dos soluciones madre: la primera conteniendo 20% de acrilamida y 0.27% de bisacrilamida, esta solución se filtra en papel Whatman No.1, para eliminar material insoluble y se

puede almacenar congelada. La segunda es una solución 20 mM de fosfato de sodio conteniendo 2% de lauril sulfato de sodio (SDS).

De la solución madre de acrilamida bisacrilamida se toman 9 ml y se mezclan con 10 ml de la solución madre de fosfatos - SDS. Se agitan cuidando de no hacer espuma y se le extrae el gas disuelto con vacío. A continuación se agregan agitando 150 µl de N,N,N',N'-tetra, metil, etilendiamina (TEMED CANALCO) y un mililitro de solución de persulfato de amonio al 3% recientemente preparada. Toda la solución se agita suavemente sin espumar y se llenan las celdas. La gelificación se lleva a cabo en un minuto sin necesidad de fotocatalisis. Las celdas preparadas para este fin tienen las siguientes dimensiones: 7.7 x 7.7 x 1.5 milímetros.

La muestra a analizar debe estar en solución, para lo cual se tratan con una "solución digestora" consistente en: 1% mercaptoetanol; 2% SDS, 48% sacarosa y 0.05% azul de bromofenol como indicador de "frente de avance".

Una vez aplicada la muestra en la celda conteniendo el gel y esta colocada en el aparato de electrofore-

-sis se llenan los depósitos electrolíticos con solución madre de fosfatos - SDS diluida 1:1. En estas condiciones se procede a la electroforesis, colocando el ánodo en el depósito electrolítico opuesto a la muestra. La diferencia de potencial en los baños electrolíticos se ajusta a una intensidad de corriente de 75 miliamperes por celda. Se suspende la electroforesis en el momento que el colorante indicador de avance llega al extremo opuesto del gel (aproximadamente 5 horas).

El gel se retira de la celda y se sumerge en un baño de TCA al 10% durante 15 minutos, para fijar las proteínas. La tinción de las proteínas en el gel se hace en una solución de 10% metanol, 7% ácido acético y 0.25% colorante azul de coomassie durante 20 minutos con agitación suave, después de lo cual para eliminar el exceso de colorante se lava en una solución similar a la anterior sin colorante hasta que las zonas carentes de proteína quedan incoloras.

5. Métodos de Incubación del Ganglio

a) Incorporación de (^{32}P)-Fosfato en condiciones basales.

i) a proteínas en ganglio sin fraccionamiento.

Con objeto de conocer la cinética de la incorporación de (^{32}P)-fosfato a las proteínas del GCS in vitro, se analizó dicha incorporación por dos tipos de experimentos con distintas técnicas pero en ambas sin proceder al fraccionamiento subcelular.

En el primero se incubaron los ganglios en cámaras individuales en la forma antes descrita, pero ahora se agrega en cada cámara a la solución de incubación fosforo radioactivo (^{32}P) en forma de ortofosfato. La actividad presente en cada cámara es de 125 μCi (462.5×10^4 dps). La solución de incubación se sustituye cada 60 minutos por solución fresca (mantenida también a 37°C) con idéntica composición y actividad.

Incubados en la solución anterior muestras de 5 ganglios se obtuvieron para cada punto, con períodos de incubación de 0, 10, 30, 60, 100, 130, 170 y 200 minutos, considerando tiempo cero, el momento de agregar la mezcla radioactiva a la cámara que contiene el ganglio.

Al terminar el tiempo de incubación el ganglio se retira de su cámara, e inmediatamente se congela en nitrógeno líquido, y se transfiere al homogenizador que se mantiene en baño de hielo ahí el ganglio se disuelve con la ayuda del piston en 40 μ l de una solución 0.1 N de NaOH.

En el segundo ensayo se procede en forma similar al primero, con la diferencia de que después de una incubación inicial en la solución radioactiva por 60 minutos, se sustituye esta solución por una equivalente pero con fósforo estable (^{31}P). Las muestras de ganglios se obtuvieron y procesaron en forma y tiempos similares al ensayo anterior.

A las diferentes soluciones protéicas en ambos ensayos se les determinó cuantitativamente proteínas y contenido de (^{32}P)-fosfato incorporado a estas.

U) a proteínas presentes en las diferentes fracciones subcelulares.

En base a los resultados de los ensayos anteriores se procedió a repetir las incubaciones en forma semejante al segundo ensayo, o sea incubación en solución ra-

-dioactiva solamente durante los primeros 60 minutos, sustituyendo en ese momento la solución por una fresca con fósforo estable.

Los ganglios en este caso finalizando su tiempo de incubación, al ser retirados no se congelan ni se disuelven en sosa sino se fraccionan con la técnica descrita en métodos.

- b) Incorporación de (^{32}P)-fosfato a proteína inducida por estimulación eléctrica.

Con objeto de observar la presencia de alguna modificación en el recambio de (^{32}P)-fosfato relacionada con la estimulación eléctrica, se incubaron ganglios en las condiciones antes descritas, por un período de 60 minutos. Después de este período de incubación se procedió a estimular los ganglios en la siguiente forma: se aplicaron pulsos con una frecuencia de 40 Hertz, cada pulso con una duración de 20 milisegundos e intensidad de 4 volts, la duración total del tren de estímulos es 20 segundos. Obteniendo muestras de ganglios en los tiempos indicados después de esta estimulación. Estos

ganglios se fraccionaron para estudiar las variaciones en la cinética de incorporación del isotopo en las diferentes fracciones.

Grupos controles fueron tratados en forma similar, con la diferencia de que en estos casos el estimulador no estaba conectado a la fuente de corriente.

RESULTADOS

En el análisis de la electrofisiología de la fibra pre-ganglionar se estudiaron algunos parámetros de la conducción; entre estos están el umbral de respuesta, la respuesta máxima y la conducción de estímulos repetitivos.

El umbral de respuesta del tronco nervioso, es el voltaje mínimo necesario para obtener una respuesta propagada en la fibra. Esta respuesta se estudió en función de dos variables; duración e intensidad del estímulo.

La duración del estímulo se varió en forma discreta en el rango de 0.01 a 10 milisegundos. En cada uno de los tiempos se varió el voltaje, para determinar el umbral de respuesta (mínimo voltaje requerido para producir una respuesta propagada). En la gráfica de los resultados (fig. 15), se observa que con estímulos de duración de 0.01 m seg no se pudo evocar una respuesta aún con los estímulos máximos usados, de 20 voltios.

La primera respuesta se observa cuando el estímulo tiene una duración de 0.02 milisegundos y una intensidad

de 15 voltios. A partir de este punto, un aumento en la duración del estímulo, produjo un descenso en voltaje necesario para observar el umbral de respuesta, alcanzándose así un valor mínimo de 3 voltios cuando la estimulación tiene una duración igual o mayor de 0.5 milisegundos. El umbral respuesta no se refiere a la respuesta de totalidad de las fibras nerviosas, sino a la respuesta de conducción de la mínima cantidad de fibras nerviosas que puede ser registrada.

El concepto de respuesta máxima en una fibra nerviosa, por el contrario se refiere al mínimo voltaje necesario en la estimulación de dicha fibra para obtener la conducción de un impulso por una población máxima de axones. Similarmente al caso anterior se estudió este parámetro en el rango de 0.01 a 20 milisegundos de duración. Aunque la aparición de la respuesta se puede observar con una duración del estímulo de 0.02 milisegundos como se describe en el párrafo anterior, con estimulaciones de corta duración no se alcanzó el límite de respuesta máxima en el registro, sin embargo, cuando se estimuló con una duración de estímulo de 0.10 milisegundos a pesar de aumentar la intensidad del estímulo no se incrementa la respuesta. A partir de este punto

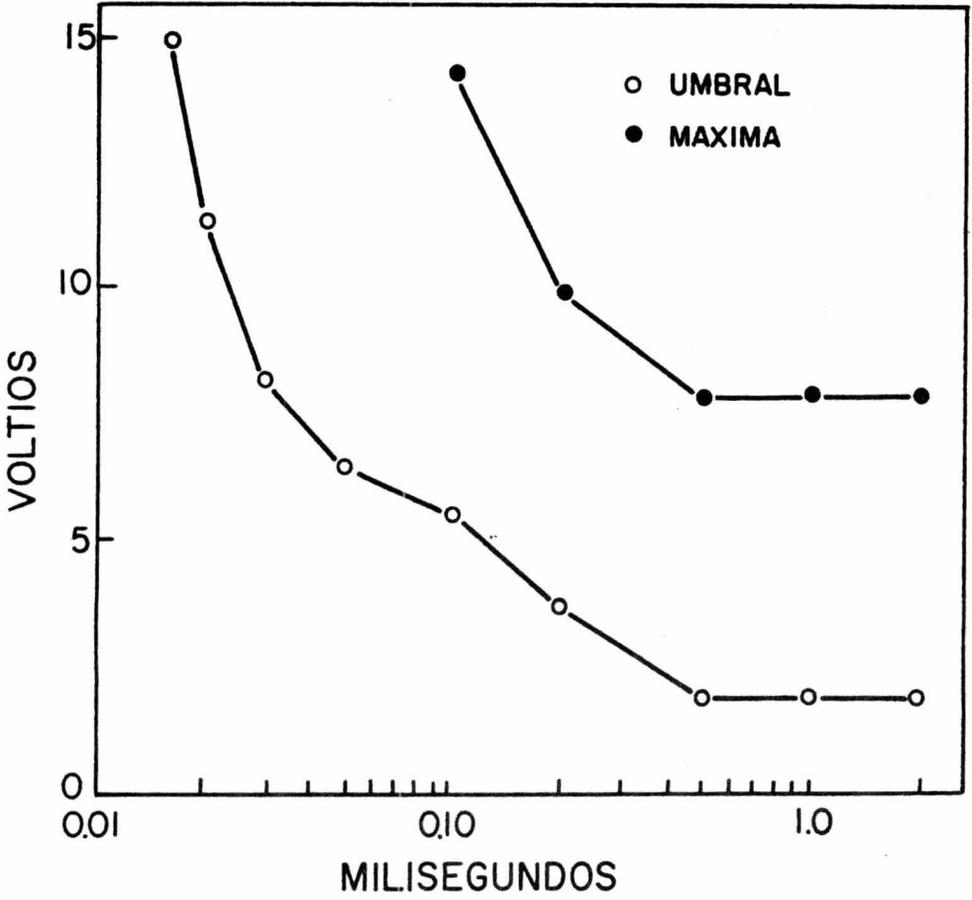


Fig. 15. Respuesta umbral y máxima en el tronco simpático.

al incrementar la duración del estímulo, disminuye rápidamente el voltaje necesario para obtener esta respuesta máxima, alcanzando un valor mínimo de 9 voltios a partir de un tiempo de duración de estímulo de 0.2 milisegundos en adelante.

La respuesta máxima, sí representa la estimulación de todas las fibras, o la mayor parte de ellas pues no hay que olvidar que lo que obtiene es un registro de población, donde la mayoría de las fibras es incapaz de propagar estímulos de duración menor de 0.1 milisegundos.

Los valores de respuesta umbral y máxima en esta fibra se presentan graficados en forma comparativa en la fig. 15.

Conociendo estas propiedades de umbral y respuesta máxima de la fibra, se estudió la conducción de pulsos en la misma, cuando se aplican en forma repetitiva con una frecuencia de 40 Hertz, una duración del tren de estímulos de 20 segundos, siendo la duración de cada pulso de 20 milisegundos. En estas condiciones la fibra fue capaz de responder en forma estable solo durante trece segundos.

Por último, si después de diez segundos de esta estimulación repetitiva se aplica un choque único, la respuesta es idéntica a la control sin presentar potenciación.

En los registros obtenidos con estímulos únicos se advierte que la respuesta está compuesta de dos ondas, que reflejan la existencia de grupos de fibras con diferente velocidad de conducción. Además la velocidad de conducción de las fibras en cada uno de estos grupos no parece ser idéntica ya que la forma de las curvas indican dispersión.

La heterogenidad de composición de la fibra preganglionar complica por supuesto el estudio de una respuesta transináptica ganglionar. En nuestro estudio por dificultades técnicas se trabajó estimulando toda la fibra y para simplificar el análisis de la respuesta se obtuvieron registros monotópicos.

El principal criterio que usamos para juzgar la presencia de relevos sinápticos de carácter químico fue la potenciación de la respuesta al ser precedida de otros estímulos, siendo esta potenciación máxima con estímulos de baja frecuencia (1 Hertz). La respuesta

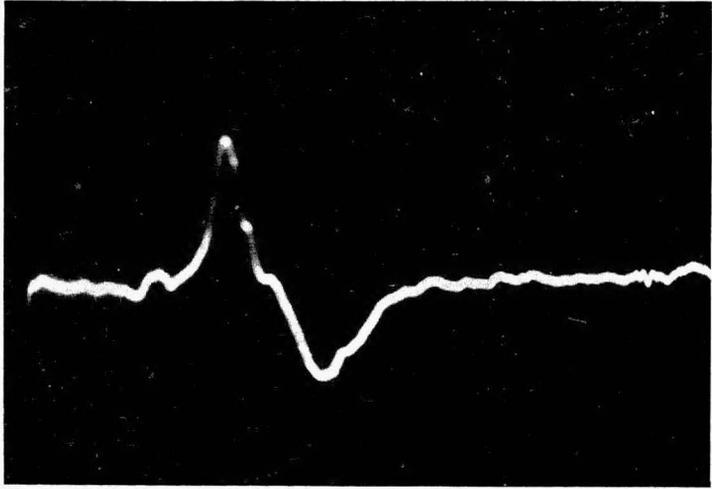


Fig. 16. Respuesta transináptica a la estimulación eléctrica en Ganglio Cervical Superior.

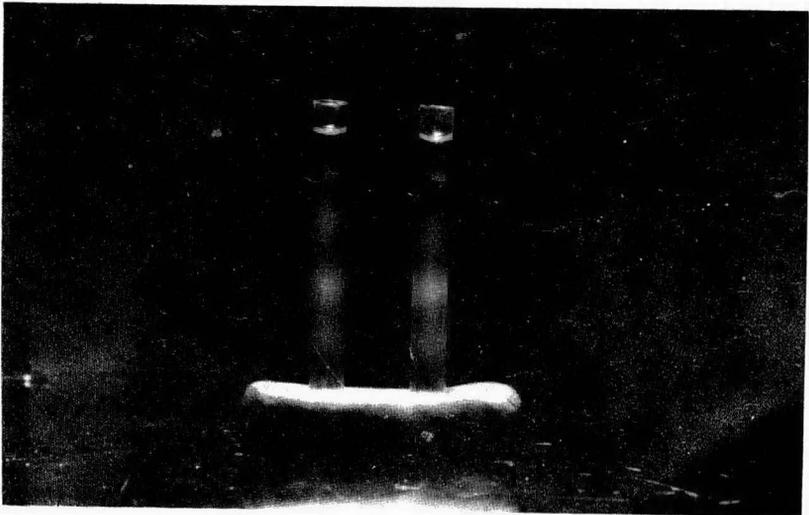


Fig. 17. Resultado del fraccionamiento de la fracción mitocondrial cruda, del Ganglio Cervical Superior en gradientes discontinuos de sacarosa.

observada en cualquiera de las fibras postganglionares antes descritas se deprimió después de estimulación repetitiva de alta frecuencia durante 10 segundos, y como era de esperarse después de este tren de estímulos, un estímulo único presenta una intensa potenciación.

La respuesta ganglionar es compleja y se ha estudiado mas ampliamente por Dunant (1967). De nuestras observaciones solamente podemos decir que en un sistema de amplificación acoplado por capacidad, se observó a groso modo una respuesta compuesta por dos ondas negativas rápidas y una positiva tardía (fig. 16), y que de estas la onda negativa de menor velocidad de conducción, es la que presentó el mayor grado de la potenciación antes descrito.

El decaimiento de la respuesta transináptica de ganglios mantenidos en incubación in vitro aún por períodos de 120 minutos no fue significativo, ni se observó ninguna modificación de esta respuesta cuando se aplicaron estímulos con una frecuencia de 40 Hertz, 4 volts, 20 milisegundos de duración, durante 20 segundos, comparando los registros con los de ganglios sin estimulación.

Homogenización del Ganglio

En el proceso de homogeneización del ganglio la velocidad de giro del pistón que se utilizó en todos los casos fue de 700 rpm aunque no se observó diferencia en los resultados aún con una velocidad de 350 rpm. Fueron factores críticos en la homogeneización, la velocidad de desplazamiento del pistón y el número de pasos de ascenso y descenso. Si estas operaciones son exageradas en velocidad o cantidad, los nucleos se destruyen y las fracciones subcelulares en los gradientes se empbrecen ó desaparecen, por lo que el pistón debe desplazarse muy lentamente en el homogenizador (aproximadamente 1.2 mm/seg) con un máximo de 3 movimientos de descenso y ascenso del pistón en el homogenizador.

Para optimizar condiciones de separación de las fracciones subcelulares, se modificaron los gradientes de sacarosa tanto en su relación volumétrica, como en su densidad, con el objeto de obtener las bandas de partículas más concentradas en las interfaces, quedando estas más separadas entre sí y evitando la presencia de material difuso en las fases (fig. 17), todo esto enfocando a la buena separación de las fracciones C y D.

La fig. 18 es una fotografía de microscopía electrónica de la fracción C. En ella están presentes membranas vesiculadas conteniendo varios tipos de estructuras. Estas membranas vesiculadas están constituidas en gran parte por terminales nerviosas mejor conocidas como sinaptosomas, en el interior de las cuales existen vesículas y mitocondrias sinápticas. Adosadas a estos sinaptosomas se pueden observar estructuras sinápticas, y la "red postsináptica". La fig. 19 muestra la población de partículas de la fracción D en donde se observan estructuras similares siendo el diámetro de vesículas mayor y a la microscopía electrónica más densa, se advierten además, estructuras mitocondriales de mayor tamaño, probablemente de origen somático, ya que estos organelos suelen estar presentes en esta fracción como contaminantes.

Patrones de Geles en Acrilamida

De las distintas técnicas de separación de proteínas en geles de acrilamida, las más comúnmente usadas son aquellas en que se utiliza dodecil sulfato de sodio

(SDS) como detergente disolvente y disociador de cadenas de polipéptidos. En estas condiciones, este detergente forma una envoltura a las proteínas confiriéndoles su carga negativa.

En la separación de proteínas por electroforesis, la migración de estas es proporcional a su carga eléctrica y el volumen relativo de la partícula respecto a la matriz reticular del gel de acrilamida-bisacrilamida. En casos como este donde las proteínas han sido tratadas con detergentes iónicos, la proteína migrará casi totalmente en función de su "volumen molecular".

Los resultados de la electroforesis de las fracciones C y D (fig. 20) presentan patrones protéicos cualitativamente distintos entre sí, y en ambos casos patrones complejos. A semejanza de algunos reportes de fracciones equivalentes en sistema nervioso central (Waehneltd and Neuhoff, 1972), se pueden observar 16 bandas en cada caso variando en migración e intensidad de la fracción C a la fracción D. Puesto que dichas proteínas emigran solamente en función de su volumen (Shapiro, et al., 1967; Weber et al., 1969), las que se han desplazado en mayor grado, poseen un "volumen molecular" menor.

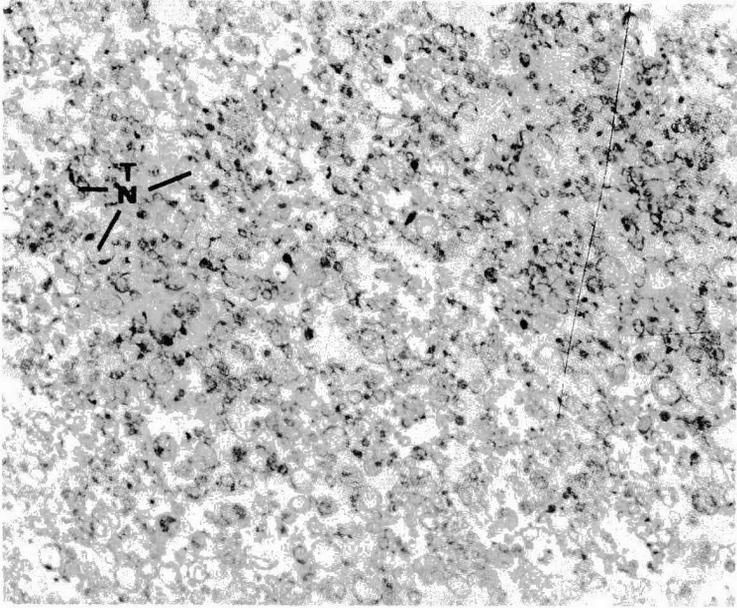


Fig. 18. Microscopía electrónica fracción C (12,000 x)
TN, terminales nerviosas.

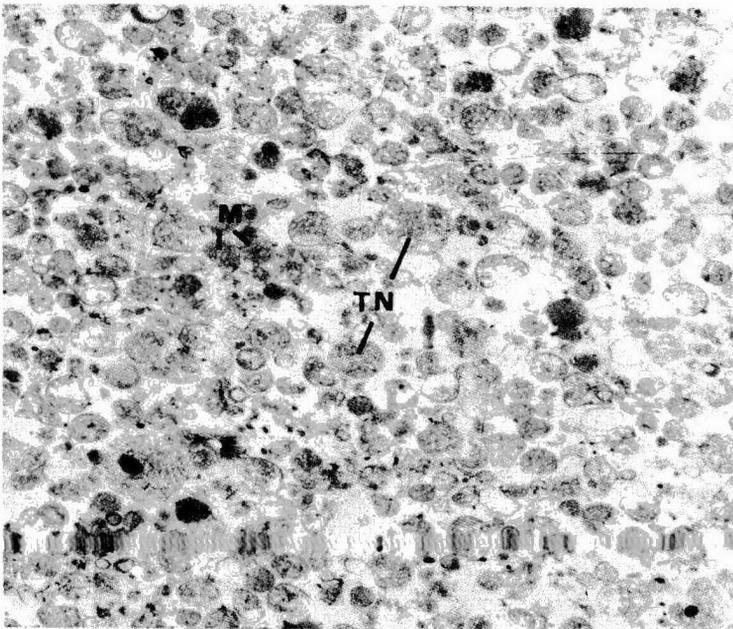


Fig. 19. Microscopía electrónica fracción D (12,000 x)
TN, terminales nerviosas, M, mitocondrias.

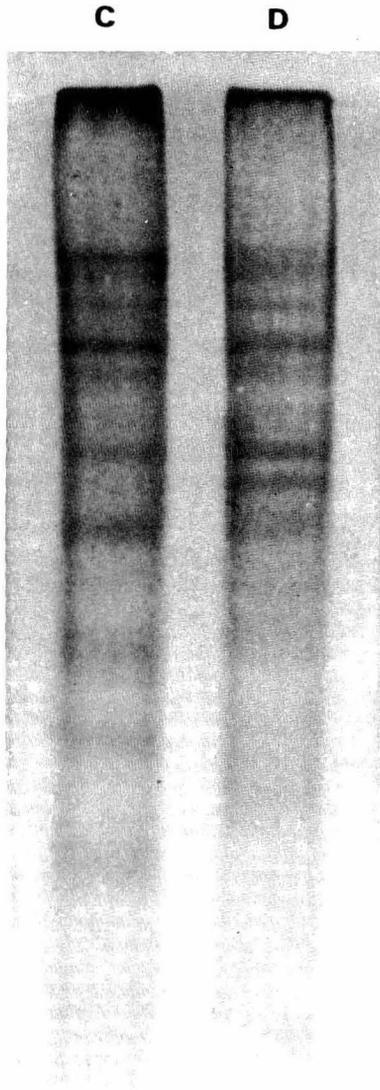


Fig. 20. Electroforesis en geles de acrilamida de las fracciones C y D.

No existen reportes anteriores en cuanto a electroforesis en geles de acrilamida de estas fracciones membranales en ganglio cervical superior, que permitan la comparación de estos resultados.

Incorporación de (32 P)-Fosfato in vitro

Pretendiendo analizar el contenido de fosfato marcado unido a proteínas en las diferentes fracciones se propició la incorporación de esta marca a las proteínas del ganglio. Esta incorporación se logró incubando el ganglio en un buffer conteniendo la marca en la forma como se describe en métodos.

La incorporación de marca al total de las proteínas del ganglio (fig. 21), no alcanza saturación en tiempos de incubación hasta de 4 horas. Durante este tiempo en la solución de incubación, se substituyó por solución fresca conteniendo la cantidad original de la marca (125 μ Ci).

Ante la imposibilidad de alcanzar la saturación de incorporación de (32 P)-fosfato en las proteínas totales,

se prefirió proporcionar solamente un pulso de dicha marca. Con este fin, se incubó el ganglio en presencia de la marca, solamente durante los 60 minutos iniciales de la incubación. En esta forma se logra alcanzar un máximo en la incorporación de fosfato marcado en el total de proteínas del ganglio (fig. 22).

Habiendo obtenido este equilibrio en la incorporación de la marca a las proteínas del ganglio sin fraccionar, se procedió a analizar la incorporación de P^{32} en las diferentes fracciones subcelulares del ganglio.

En las figs. 23 y 24, se grafican los datos de la variación de actividad específica de las fracciones soluble y nuclear, así como las subfracciones membranales C y D en función del tiempo. En dichas gráficas se consideró como tiempo cero, el momento en que se retira la solución conteniendo fósforo radioactivo y se sustituye por la solución conteniendo fósforo estable.

Las proteínas constitutivas de las fracciones soluble y nuclear alcanzan máximo de incorporación a un tiempo más prolongado que las fracciones sinaptosomales (C y D) sobre todo probablemente debido a que las primeras están constituidas por una cantidad mucho mayor de proteínas. Aunque no se calculó la cantidad de proteína



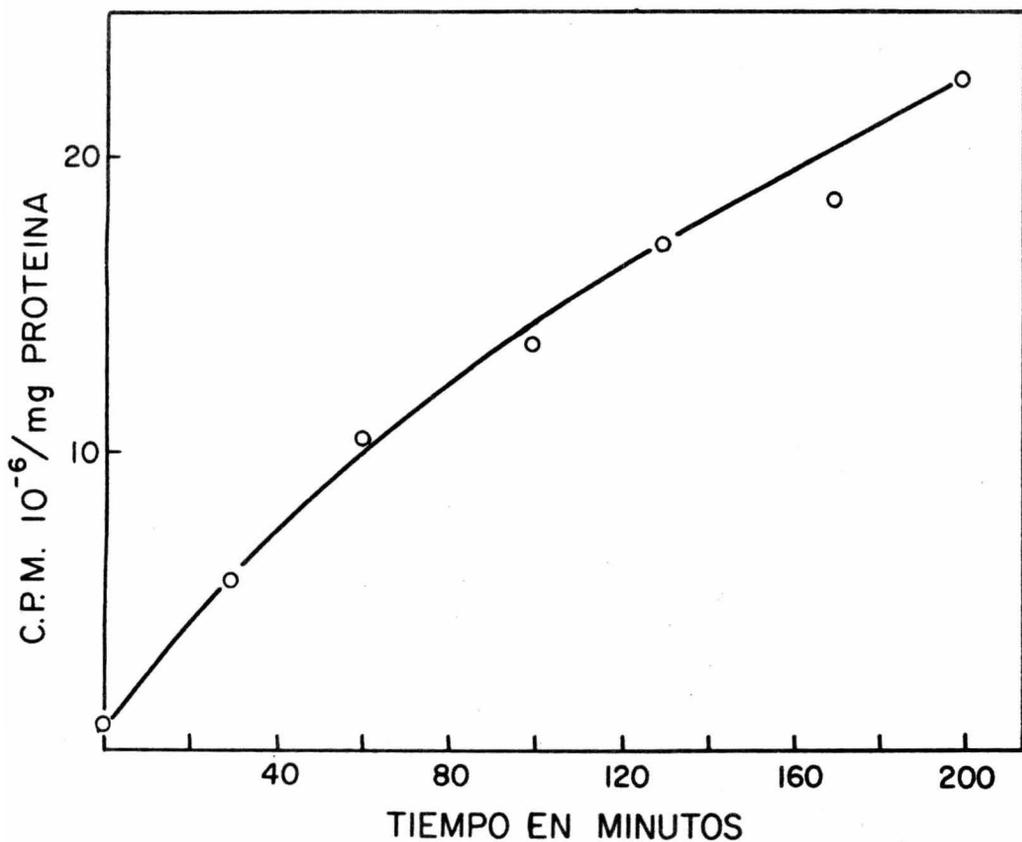


Fig. 21. Incorporación de (^{32}P)-fosfato a proteínas totales del Ganglio Cervical Superior. Incubación en solución conteniendo el isotopo radioactivo durante 200 minutos.

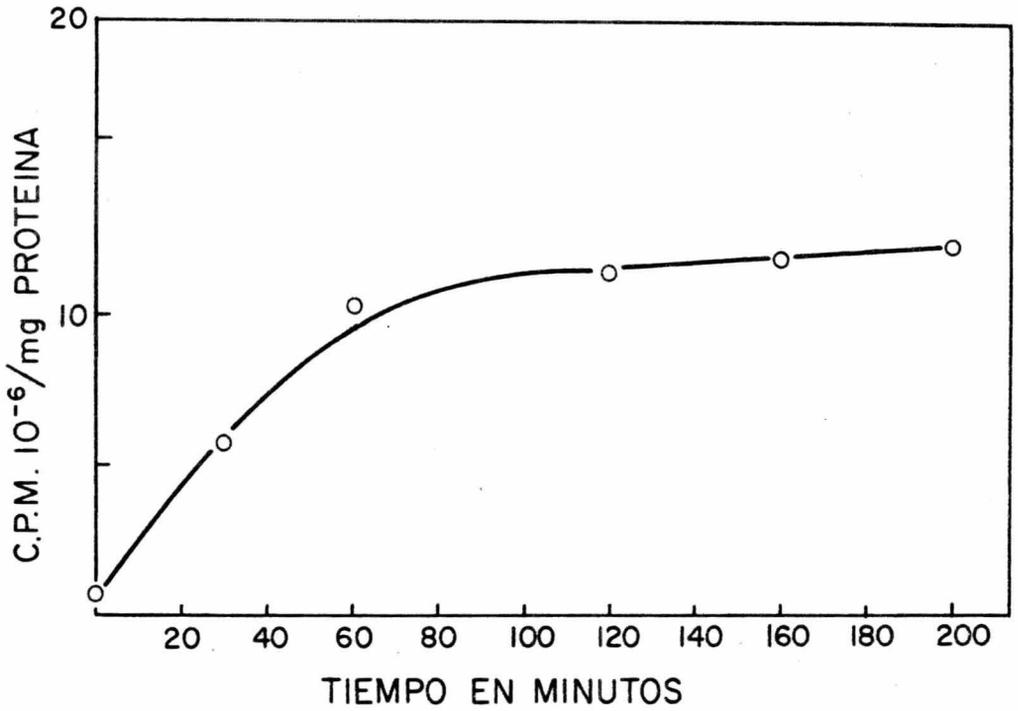


Fig. 22. Incorporación de (^{32}P)-fosfato a proteínas totales del Ganglio Cervical Superior. Incubando en solución conteniendo el isotopo radioactivo durante los primeros 60 minutos.

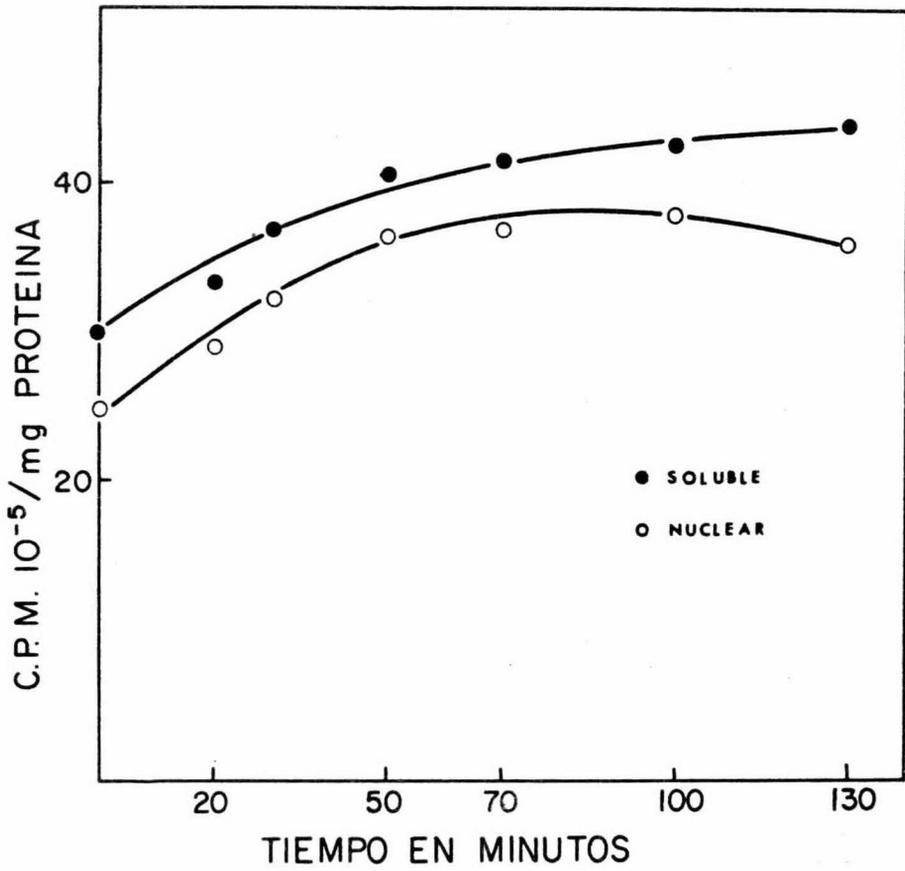


Fig. 23. Incorporación de (^{32}P)-fosfato a proteínas presentes en las fracciones soluble y nuclear.

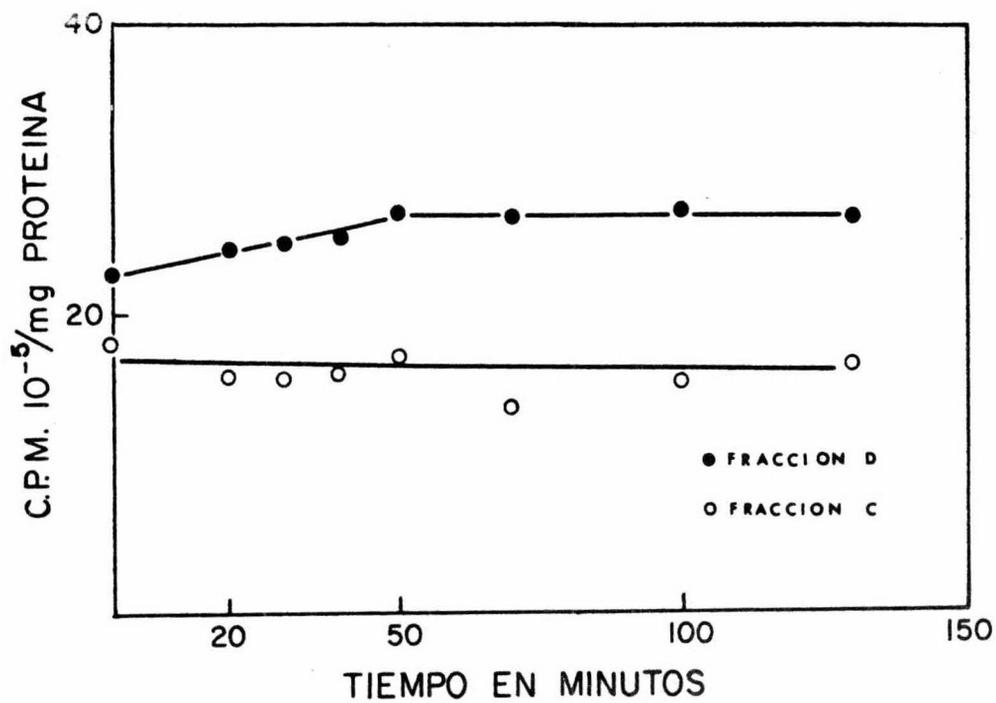


Fig. 24. Incorporación de (^{32}P)-fosfato a proteínas presentes en las fracciones C y D.

en un ganglio se observó que las fracciones soluble y nuclear contienen la mayor parte de la proteína pues la fracción mitocondrial cruda obtenida de 5 ganglios contiene aproximadamente 10 μ g de proteína solamente.

La actividad específica aproximada en el punto máximo en la fracción soluble y la nuclear es 42 y 37 x 10^5 cpm/mg de proteína, y en las fracciones C y D es de 16 y 26 x 10^5 cpm/mg proteínas respectivamente.

Los valores anteriores de incorporación de (P^{32})-fosfato son valores obtenidos en condiciones basales de funcionalidad de los ganglios. Comparativamente se determinó la influencia de la estimulación transináptica del ganglio en la incorporación de (P^{32})-fosfato de las diferentes fracciones celulares.

Grupos de ganglios tratados en la forma descrita se obtuvieron a los tiempos indicados después de la estimulación. El análisis de la actividad específica incorporación de (P^{32})-fosfato a proteínas, mostró clara variación en las proteínas de las subfracción C exclusivamente, no observándose cambio alguno en las otras fracciones.

Esta variación en el recambio de fosfato manifestada como un incremento de la actividad específica de las proteínas presentes en la fracción C se empezó a observar 30 minutos después de la estimulación eléctrica, mostrando una actividad máxima a los 40 minutos, tiempo después del cual se restablece su actividad al mismo nivel que se encontraba inicialmente.

La variación de la actividad específica en el momento de máxima actividad es de 50% mayor que el estado basal de la fracción C.

No se observaron variaciones significativas en la incorporación de las otras subfracciones celulares, ni aún en la fracción D (fig. 26), la que contiene también sinaptosomas.

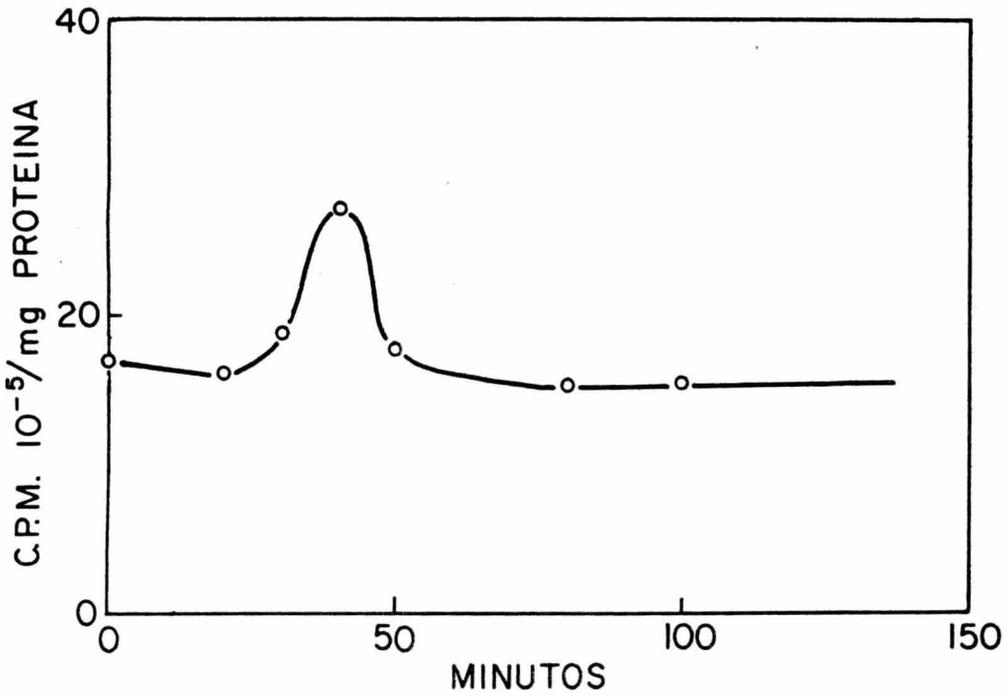


Fig. 25. Incorporación de (^{32}P)-Fosfato a proteínas de la fracción C cuando el Ganglio Cervical Superior ha sido estimulado eléctricamente al tiempo cero en sus vías aferentes.

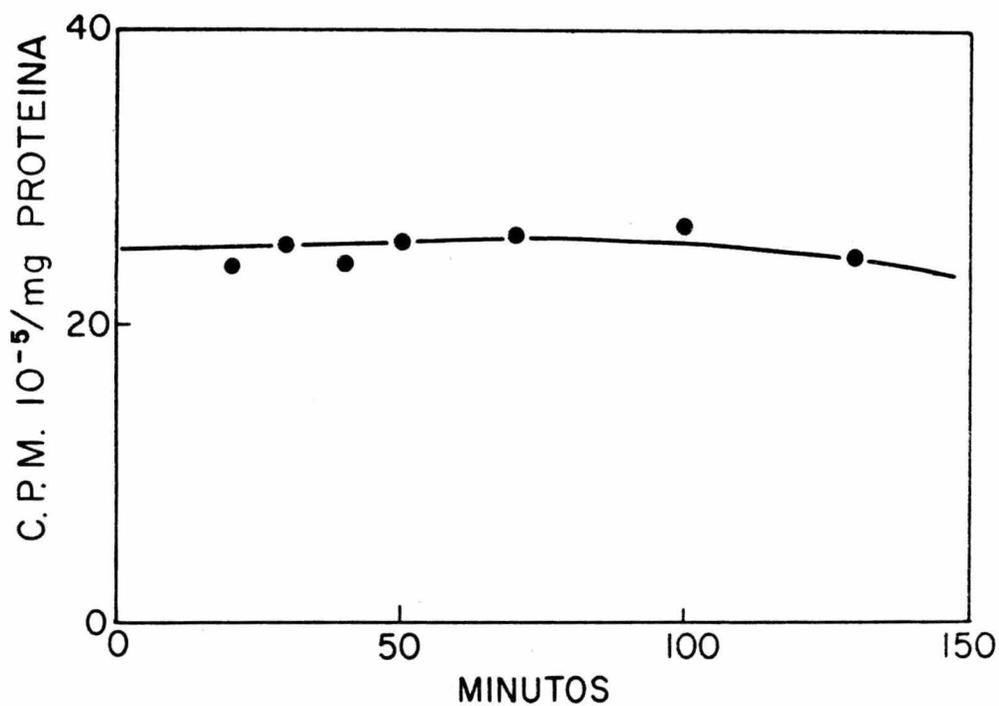


Fig. 26. Incorporación de (^{32}P)-fosfato a proteínas de la fracción D cuando el Ganclio Cervical Superior ha sido estimulado eléctricamente al tiempo cero en sus vías aferentes.

DISCUSION Y CONCLUSIONES

La observación de que gran cantidad de respuestas a estímulos hormonales son mediadas por proteína-cinasas dependientes de AMP cíclico en múltiples tejidos animales, sugiere que la investigación de los sustratos de estas enzimas, reportados tanto a nivel de membrana plasmática, como ribosomas, citoplasma y cromatina, pudiera ser fructífera en la elucidación del mecanismo fisiológico íntimo de la acción hormonal.

Estas esperanzas se han encontrado con serias dificultades, debido en gran parte a la presunta poca especificidad de las proteína-cinasas, pues hay una contradicción aparente en la afinidad por múltiples sustratos en una enzima que juega un papel central en mecanismos regulatorios.

Esta aparente inespecificidad enzimática se resuelve si se observa que cuanto más fisiológico es el sistema de estudio a investigar, más restringida está la efectividad de estas proteína-cinasas, respecto a los

sustratos protéicos fosforilables, lo que implica que la especificidad puede estar asociada a la disponibilidad topográfica del sustrato. Si es este el caso, el estudio del mecanismo debe intentar realizarse procurando alterar en el menor grado posible, el estado natural del sistema.

En el sistema nervioso de animales superiores, es difícil encontrar un modelo sináptico que pueda aislarse sin ser modificado y que permita aún in vitro la estimulación de la totalidad de sus vías aferentes. El Ganglio Cervical Superior presenta estas entre otras ventajas sobre las estructuras del sistema nervioso central. A pesar de estas ventajas, no se debe ignorar que la estimulación indiscriminada y repetitiva de las vías aferentes en un centro de relevos sinápticos, produce una gran cantidad de interacciones con resultados inhibitorios y/o excitatorios, cuyos componentes en general no son analizables con facilidad.

Sin embargo, es posible que la estimulación indiscriminada y repetitiva sea capaz de desencadenar la actividad de mecanismos bioquímicos, como aparentemente sucede en el caso aquí presentado.

Es atractiva la suposición de que la fosforilación estudiada, al alterar la estructura de las proteínas mismas pueda modificar entre otras cosas las propiedades de la membrana, al provocar cambios conformacionales y de aumento de carácter hidrofílico de la proteína involucrada, lo que presentaría un panorama muy interesante en células en que es importante la regulación de la permeabilidad de la membrana a iones de los medios electrolíticos que limita. Efectivamente, la fosforilación en el sistema escogido, parece ser más selectiva en cuanto que se afectan fundamentalmente proteínas membranales sinápticas.

El sistema de fosforilación estudiado no es activo como respuesta general a la estimulación por cualquiera de los neurotransmisores conocidos y en particular no se ha buscado como respuesta a la estimulación de sinapsis colinérgicas, que es el caso de las células preganglionares en el GCS. Por falta de demostración de que la acetilcolina estimule al sistema del AMP cíclico, se ha supuesto que este neurotransmisor es incapaz de llevar a cabo esta función, aunque sí se ha demostrado que la acetilcolina es capaz de estimular la síntesis de GMP cíclico.

Por los motivos anteriores y suponiendo que el GCS sea farmacológicamente similar al sistema nervioso central es necesaria la existencia de otro neurotransmisor presente en el ganglio que sea capaz de desencadenar la actividad del sistema del AMP cíclico, con la consecuente fosforilación de proteínas membranales.

Se ha reportado en GCS la presencia de otro neurotransmisor que podría cumplir con estos requisitos, la dopamina, que es presunta mediadora entre las interneuronas y las neuronas ganglionares propiamente dichas, desempeñando las primeras probablemente una función de modulación en esta comunicación. La dopamina que es un neurotransmisor adrenérgico, se ha descrito como capaz de evocar la actividad del sistema del AMP cíclico en el GCS (Kebabian and Greengard, 1971).

Ahora bien, en homogenado de corteza cerebral se ha observado que la distribución de las enzimas involucradas en el metabolismo de la acetilcolina se encuentran preferentemente en la subfracción C de la fracción mitocondrial cruda, y no existiendo antecedentes a este

respecto en el homogenado de ganglio, se puede suponer una distribución similar de dichas enzimas, lo que no excluye la existencia en la misma subfracción de sinaptosomas mediados químicamente por otro neurotransmisor.

Por los motivos arriba expuestos, se esperaba que la fosforilación de proteínas sinaptosomales ocurriera preferentemente en la subfracción mitocondrial D, donde predominan los neurotransmisores no colinérgicos (adrenérgicos, GABA, etc).

En esta situación dos soluciones pueden sugerirse para interpretar esta actividad; la existencia de otros sinaptosomas con distinto neurotransmisor y con distribución similar a los de la acetilcolina, ó las mismas de acetil-colina que pudieran provocar la estimulación del sistema del AMP cíclico.

Simultáneamente a la fosforilación, en nuestro laboratorio se estudió, la activación de una proteína-cinasa dependiente de AMP cíclico en el GCS, como consecuencia de la estimulación repetitiva, observándose una secuencia temporal en el incremento del nucleótido cíclico

(AMP cíclico) y la actividad de la proteína cinasa (Bayón, 1974). En los dos casos anteriores por dificultades técnicas no se estudió la distribución subcelular de las actividades enzimáticas.

La fosforilación de proteínas de terminales nerviosas, se observa en otros laboratorios en trabajos simultáneos a este, en sistemas libres de células tales como sinaptosomas (por ejemplo los doctores Paul Greengard y Richard Rodnight). En esos trabajos la estimulación de la actividad de proteína-cinasas, se realiza agregando concentraciones elevadas de AMP cíclico, a una suspensión de sinaptosomas. Es de esperarse que la estimulación a través de este segundo mensajero provoque la activación de todas las proteína-cinasas dependientes de AMP cíclico y consecuentemente dar como respuesta, varios sustratos fosforilados.

Como se menciona en la sección de generalidades, Greengard solo observa la fosforilación de dos proteínas en estas fracciones (difícil de discernir si ocurre esta fosforilación simultánea o sucesivamente). Esta fosforilación es casi inmediata a la estimulación.

por AMP cíclico y no se buscan respuestas en tiempos ma
yores a dos minutos de incubación.

La utilización de sistemas libres de células en es
tos estudios presenta inconvenientes como la estimula-
ción generalizada de proteína-cinasas, de las cuales al
gunas pueden no estar involucradas en fenómenos sinápti-
cos. También pueden alterar estas condiciones el desa-
rrollo temporal de la aparición de la respuesta y elimi-
nar interacciones a nivel estructural.

A pesar de lo poco comparable de los modelos de ex
perimentación, los resultados de los trabajos en sinap-
tosomas pueden ser compatibles o complementarios con
los aquí obtenidos.

Parece pues que es válido suponer que en el ganglio
existen respuestas metabólicas a la estimulación sinápti-
tica con diferentes velocidades de aparición, las que
pudieran encontrarse en las diferentes vías del ganglio
produciendo distintas fosforilaciones de sustratos pro-
téicos que corresponden a respuestas fisiológicas dis-
tintas.

Se ha buscado muy frecuentemente modificaciones en "la eficiencia" de la comunicación neuronal como consecuencia de su actividad previa, lo que indicaría que la sinapsis desarrolla mecanismos modulatorios de su actividad en base a esa información, aún tiempo después de haberse transmitido y propagado la señal eléctrica. Algunas modificaciones de este tipo se han observado en sistemas neuronales que involucran sinapsis que varían su "eficiencia" de transmisión (Luco, 1939; Blis, 1973). Sería interesante realizar experimentos que permitieran aclarar alguna relación de los resultados bioquímicos aquí observados y las modificaciones fisiológicas paralelas observadas en esos modelos.

El GCS es un modelo de trabajo muy ventajoso por las razones antes descritas, y donde se pueden estudiar ampliamente las interacciones de las diferentes vías sinápticas, si se hace uso de la farmacología y los resultados bioquímicos hasta hoy obtenidos.

Para aplicarse en la identificación de los substratos protéicos de las cinasas y estudiar las modificaciones fisiológicas subsecuentes a estas actividades enzimáticas, será necesario adelantar en el conocimiento de

la farmacología bioquímica y fisiología del ganglio y utilizar técnicas de trabajo in situ, que permitan la observación de las modificaciones en las respuestas de los diferentes órganos efectores, mediados por el GCS y así poder verificar si esta fosforilación de material protéico en las sinapsis está asociada con algún cambio funcional en dichas regiones sinápticas.

REFERENCIAS

- Alemán, V., Bayón, A. and Molina, J. (1974).
Functional changes of synapses. Neurohumoral
Coding of Brain Functions. 115-124. Ed. Myers and
Drucker-Colín. Plenum Pub. Co. New York.
- Alemán, V., Bayón, A. and Molina, J. (1974).
Los sistemas de los nucleótidos cíclicos en el te-
jido nervioso. Los Perfiles de la Bioquímica en
México. Ed. J. Mora, S. Estrada-O., J.
Martuscelli. U.N.A.M. México.
- Banks, P. (1970).
The effect of preganglionic stimulation on the
incorporation of L-(U-¹⁴C) valine into protein of
the superior cervical ganglion of the guinea pig.
Biochem. J. 118, 813-818.
- Bayón, A. (1975).
Tesis de Maestría en Ciencias. Facultad de Cien-
cias Químicas, U.N.A.M. México.
- Bayón, A., Alemán, V. and Molina, J. (1973).
El papel del AMP cíclico en la función sináptica.
Ciencia, Méx. XXVIII, 163-175.

Bliss, T.V. and Lømo, T. (1973).

Long-lasting potentiation of synaptic transmission in the dentate area of the anaesthetized rabbit following stimulation of the perforant path.

J. Physiol. 232, 331-356.

Bradham, L.S. (1972).

Comparison of the effects of Ca^{2+} and Mg^{2+} on the adenylyl cyclase of calf brain. Biochim. Biophys.

Acta 276, 434-443.

Butcher, R.W. and Sutherland, E.W. (1962).

Adenosine 3',5'-phosphate in biological materials.

J. Biol. Chem. 237, 1244-1250.

Cheung, W.Y. (1967).

Properties of cyclic 3',5'-nucleotide phosphodiesterase from rat brain. Biochemistry 6,

1079-1087.

Cheung, W.Y. (1971).

Cyclic 3',5'-nucleotide phosphodiesterase effect of divalent cations. Biochim. Biophys. Acta 242,

395-409.

De Robertis, E., Pellegrino de Irald, A. Rodríguez de Lores, A.G., Salganicoff, L. (1962).

Cholinergic and non-cholinergic nerve endings in rat brain. I. J. Neurochem. 9, 23-35.

De Robertis, E., Rodríguez de Lores, A.G., and Alberici, M. (1967).

Subcellular distribution of adenylyl cyclase and

phosphodiesterase in rat brain cortex. J. Biol. Chem. 242, 3487-3493.

Douglas, W.W. and Ritchie, J.M. (1956).

The conduction of impulses through the superior cervical and accessory cervical ganglia of the rabbit. J. Physiol. London, 133, 220-231.

Dunant, Y. (1967).

Organization topographique et fonctionnelle du ganglion cervical supérieur chez le Rat. J. Physiol. Paris, 59, 17-38.

Dunant, Y. and Dolivo, M. (1968).

Presynaptic recording in excised sympathetic ganglion of the rat. Brain Research, 10, 268-270.

Dunant, Y. and Dolivo, M. (1968).

Plasticity of synaptic functions in the excised sympathetic ganglion of the rat. Brain Research, 10, 271-273.

Drummond, I.G. (1973).

Metabolism and functions of cyclic AMP in nerve. Progress in Neurobiology, 2, 119-176.

Exley, K.A. (1954).

Depression of autonomic ganglia by barbiturates. Br. J. Pharmacol. 9, 170-181.

García Ramos, J. (1973).

Comunicaciones Personales.

- Gaballah, S. and Popoff, C. (1971).
Localization of adenosine 3',5'-monophosphate-dependent protein kinase in brain. *J. Neurochem.* 18, 1795-1797.
- Greengard, P. and Kuo, J.F. (1970).
On the mechanism of action of cyclic AMP. *Adv. Psychopharm.* 3, 287-306. Ed. Greengard and Costa. N.Y. Raven Press.
- Heald, P.J. (1954).
Rapid changes in creatine phosphate level in cerebral cortex slices. *Biochem. J.* 57, 673-679.
- Heald, P.J. (1957).
The incorporation of phosphate into cerebral phosphoprotein promoted by electrical impulses. *Biochem. J.* 66, 659-663.
- Hofmann, F. and Sold, G. (1972).
A protein kinase activity from rat cerebellum stimulated by guanosine-3',5'-monophosphate. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 49, 1100-1107.
- Johnson, E.M., Maeno, H. and Greengard, P. (1971).
Phosphorylation of endogenous protein of rat brain by cyclic adenosine 3',5'-monophosphate-dependent protein kinase. *J. Biol. Chem.* 246, 7731-7739.
- Johnson, E.M., Ueda, T., Maeno, H. and Greengard, P. (1972).
Adenosine 3',5'-monophosphate-dependent phosphorylation of a specific protein in synaptic membrane fractions from rat cerebrum. *J. Biol. Chem.* 247, 5650-5652.

- Jones, D.A. and Rodnight, R. (1971).
Protein-bound phosphorylserine in acid hydrolysates
of brain tissue. *Biochem. J.* 121, 597-600.
- Kakiuchi, S. and Rall, T.W. (1968).
Studies on adenosine 3',5'-phosphate in rabbit
cerebral cortex. *Mol. Pharmacol.* 4, 379-388.
- Kakiuchi, S., Rall, T.W. and McIlwain, H. (1969).
The effect of electrical stimulation upon the
accumulation of adenosine 3',5'-phosphate in
isolated cerebral tissue. *J. Neurochem.* 16,
485-491.
- Kakiuchi, S., Yamazaki, R. and Teshima, Y. (1971).
Cyclic 3',5'-nucleotide phosphodiesterase IV. Two
enzymes with different properties from brain.
Biochem. Biophys. Res. Comm. 42, 968-974.
- Kessler, B. and Levinstein, R. (1974).
Adenosine 3',5'-cyclic monophosphate in higher
plants: assay, distribution, and age-dependency.
Biochim. Biophys. Acta 343, 156-166.
- Kebabian, J.W. and Greengard, P. (1971).
Dopamine sensitive adenyl cyclase: Possible role
in synaptic transmission. *Science* 174, 1346-1349.
- Krebs, G.E. (1972).
Protein kinases. *Current Topics in Cellular
Regulation.* 5, 99-133.

- Krebs, E.G., De Lange, R.J., Kemp, R.G. and Riley, W.D. (1966).
Activation of skeletal muscle phosphorilase.
Pharmacol. Rev. 18, 163-171.
- Kuo, J.F. and Greengard, P. (1969a).
Cyclic nucleotide-dependent protein kinases. IV.
Widespread occurrence of adenosine 3',5'-monophosphate-dependent protein kinase in various tissues and phyla of the animal kingdom. Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A. 64, 1349-1355.
- Kuo, J.F., and Greengard, P. (1969b).
An adenosine 3',5'-monophosphate-dependent protein kinase from *Escherichia coli*. J. Biol. Chem. 244, 3417-3419.
- Kuo, J.F., and Greengard, P. (1970).
Cyclic nucleotide-dependent protein kinase VI.
Isolation and partial purification of a protein kinase activated by guanosine 3',5'-monophosphate. J. Biol. Chem. 245, 2493-2498.
- Kuo, J.F., Krueger, B.K., Sanes, J.R. and Greengard, P. (1970).
Cyclic nucleotide dependent protein kinases. V.
Preparation and properties of adenosine 3',5'-monophosphate-dependent protein kinase from various bovine tissues. Biochim. Biophys. Acta. 212, 79-91.

- Kuo, J.F., Wyatt, G.R. and Greengard, P. (1971).
Cyclic nucleotide-dependent protein kinases. IX.
Partial purification and some properties of guano-
sine 3',5'-monophosphate-dependent and adenosine
3',5'-monophosphate-dependent protein kinases from
various tissues and species of arthropods.
J. Biol. Chem. 246, 7159-7167.
- Lanari, A. and Rosenblueth, A. (1939).
The fifth stage of transmission in autonomic
ganglia. Am. J. Physiol. 127, 347-355.
- Langan, T.A. (1973).
Protein kinases and protein kinase substrates.
Advances in Cyclic Nucleotide Research. 3, 99-153,
Ed. Greengard and Robison, Raven Press, N.Y.
- Larrabee, M.G. and Bronk, W.T. (1952).
Metabolic requirements of sympathetic neurons.
Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative
Biology, 67, 145-254.
- Lee, T., Kuo, J.F., and Greengard, P. (1972).
Role of muscarinic cholinergic receptors in regula-
tion of guanosine 3',5'-cyclic monophosphate
content in mammalian brain, heart muscle and
intestinal smooth muscle. Proc. Nat. Acad. Sci.
U.S.A. 69, 3287-3291.

Loeving, U.E. (1967).

The fractionation of high-molecular weight ribonucleic acid by polyacrylamide-gel electrophoresis. *Biochem. J.* 102, 251-257.

Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L., and Randall, R.J. (1951).

Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193, 265-275.

Luco, J.V. and Rosenblueth, A. (1939).

Neuromuscular "transmission-fatigue" produced without contraction during curarization. *Am. J. Physiol.* 126, 58-65.

Luco, J.V. (1974).

Comunicaciones personales.

Maeno, H. and Greengard, P. (1972).

Phosphoprotein phosphatases from rat cerebral cortex. Subcellular distribution and characterization. *J. Biol. Chem.* 247, 3269-3277.

Maeno, H., Johnson, E. and Greengard, P. (1971).

Subcellular distribution of adenosine 3',5'-monophosphate-dependent protein kinase in rat brain. *J. Biol. Chem.* 246, 134-142.

Mans, J.R. and Novelli, G.D. (1961).

Measurement of the incorporation of radioactive aminoacids into protein by a filter paper disk method. *Arch. Biochem. Biophys.* 94, 48-53.

- McAfee, D.A., Schorderet, M. and Greengard, P. (1971).
Adenosine 3',5'-monophosphate in nervous tissue,
increase associated with synaptic transmission.
Science 171, 1156-1158.
- Miyamoto, E., Kuo, J.F., and Greengard, P. (1969a).
Adenosine 3',5'-monophosphate-dependent protein
kinase from brain. Science 165, 63-65.
- Miyamoto, E., Kuo, J.F. and Greengard, P. (1969b).
Cyclic nucleotide dependent protein kinases. III.
Purification and properties of adenosine 3',5'-
monophosphate-dependent protein kinase from bovine
brain. J. Biol. Chem. 244, 6395-6402.
- Miyamoto, E., Petzold, G.L., Harris, J.S. and Greengard,
P. (1971).
Dissociation and concomitant activation of adenosine
3',5'-monophosphate-dependent protein kinase by
histone. Biochem. Biophys. Res. Comm. 44, 305-312.
- Patton, H.D. (1966).
The autonomic nervous system. Physiology and
Biophysics Press. Ed. Roch, Patton, ed. W.B.
Sanders Co. Philadelphia and London.
- Perkins, J.P. and Moore, M.M. (1971).
Adenyl cyclase of rat cerebral cortex. J. Biol.
Chem. 246, 62-68.

- Rall, T.W., Sutherland, E.W. and Berthet, J. (1951).
The relationship of epinephrine and to liver
phosphorilase. IV. J. Biol. Chem. 224, 463-475.
- Reddington, M., Rodnight, R. and Williams, M. (1973).
Turnover of protein-bound serine in respiring
slices of guinea pig cerebral cortex. Biochem.
J. 132, 475-482.
- Robison, G.A., Butcher, R.W. and Sutherland, E.W. (1968).
Cyclic AMP. Ann. Rev. Biochem. 37, 149-174.
- Robison, G.A. Butcher, R.W. and Sutherland, E.W. (1971).
Cyclic AMP. Academic Press, N.Y.
- Rosenblueth, A. and Luco, J.V. (1939).
The fifth stage of neuromuscular transmission.
Am. J. Physiol. 126, 39-57.
- Shapiro, A.L., Viñuela, E. and Maizel, J.V. (1967).
Molecular weight estimation of polipeptide chains
by electrophoresis in SDS-poliacrilamide gels.
Biochem. Biophys. Res. Comm. 28, 815-820.
- Shimizu, H. and Daly, J. (1970).
Formation of cyclic adenosine 3',5'-monophosphate
from adenosine in brain slices. Biochim. Biophys.
Acta, 222, 465-473.

- Steiner, A.L., Parker, C.W. and Kipnis, D.M. (1970).
Themesurement of cyclic, nucleotides by radio
immunoassay. Adv. in Biochem. Psychopharm. 89-111.
Ed. Greengard and Costa, N.Y. Raven Press.
- Sutherland, E.W. and Rall, T.W. (1958).
Fractionation and characterization of cyclic
adenosine ribonucleotide formed by tissue particles.
J. Biol. Chem. 232, 1077-1091.
- Sutherland, E.W. and Rall, T.W. (1960).
The relation of adenosine-3',5'-phosphate and
phosphorilase to the actions of catecolamines and
other hormones. Pharmacol. Revs. 12, 265-299.
- Sutherland, E.W., Øye, I. and Butcher, R.W. (1965).
Action of epinephrine and the role of adenyl
cyclase systems in hormone action. Recent
Progress Hormone Res. 21, 623-646.
- Sutherland, E. W., Rall, T.W. and Menon, T. (1962).
Adenyl cyclase. I. Distribution, preparation and
properties. J. Biol. Chem. 237, 1220-1227.
- Trevor, A.J. and Rodnight, R. (1965).
The subcellular localization of cerebral phospho-
proteins sensitive to electrical stimulation.
Biochem. J. 95, 889-896.
- Ueda, T., Maeno, H. and Greengard, P. (1973).
Regulation of endogenous phosphorylation of
specific proteins in synaptic membrane fractions
from rat brain by adenosine 3',5'-monophosphate.
J. Biol. Chem. 248, 8295-8305.

Volle, L.R. (1972).

Introduction to the nervous system. Drill's
Pharmacology in Medicine. Ed. Di Palma. McGraw-
Hill, New York.

Waehneltd, T.V. and Neuhoff, V. (1972).

Membrane proteins of the nervous system.
Naturewissenschaften. 59, 232-239.

Walsh, D.A., Krebs, E.G., Reimann, E.M., Brostrom, M.A.,
Corbin, J.D., Hickenbottom, J.P., Soderling, T.R.
and Perkins, J.P. (1970).

The receptor protein for cyclic AMP in the control
of clicogenolisis. Adv. Biochem. Psychopharm. 3,
265-285. Ed. Greengard, and Costa, N.Y. Raven
Press.

Walsh, D.A., Perkins, J.P. and Krebs, E.G. (1968).

An adenosine 3',5'-monophosphate dependent protein
kinase from rabbit skeletal muscle. J. Biol.
Chem. 243, 3763-3765.

Weber, K. and Osborn, M. (1969).

The reliability of molecular weight determinations
by dodecil sulfate poliacrilamide gel electropho-
resis. J. Biol. Chem. 244, 4406-4412.

Weiss, B. and Costa, E. (1968).

Regional and subcellular distribution of adeny
cyclase and 3',5'-cyclic nucleotide phosphodiester-
ase in brain and pineal gland. Biochem. Pharmacol.
17, 2107-2116.

- Weller, M. and Rodnight, R. (1970).
Stimulation by cyclic AMP of intrinsic protein kinase activity in ox brain membrane preparations. Nature, 225, 187-188.
- Weller, M. and Rodnight, R. (1971).
Turnover of protein-bound phosphorylserine in membrane preparations from ox brain catalized by intrinsic kinase and phosphatase activity. Biochem. J. 124, 393-406.
- Weller, M. and Rodnight, R. (1973a).
The state of phosphorylation in vivo of membrane-bound phosphoproteins in rat brain. Biochem. J. 133, 387-389.
- Weller, M. and Rodnight, R. (1973b).
Protein kinase activity in membrane preparations from ox brain. Biochem. J. 132, 483-492.
- Williams, M., Pavlik, A. and Rodnight, R. (1974).
Turnover of protein phosphorus in respiring slices of guinea pig cerebral cortex: cellular localization of phosphoprotein sensitive to electrical stimulation. J. Neurochem. 373-376.

RECONOCIMIENTO

Agradezco al Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional, las facilidades para desarrollar esta tesis.

Al Dr. Víctor Alemán, el apoyo durante el largo desarrollo de esta tesis.

Al Dr. Joaquín V. Luco, la asistencia y orientación no solo en las técnicas fisiológicas.

Al Dr. Juan García Ramos, por sus consejos y/o facilitación del laboratorio de Fisiología.

A la Srta. Concepción Escalante, por la reproducción mecanográfica de la presente tesis.

Y a todo el personal del C.I.E.A. del I.P.N., que amablemente colaboró en una u otra forma a mis estudios en dicho Centro.

INDICE DE FIGURAS

1. Sistema del AMP cíclico
2. Adenosin 3',5'-Monofosfato
3. Exposición de paquetes neurovasculares
4. Presentación de la fibra preganglionar
5. Colocación de electrodos para registro de conducción en tronco simpático
6. Escisión del Ganglio Cervical Superior
7. Descapsulamiento del Ganglio Cervical Superior para estudios in vitro
8. Cámaras de incubación mostrando electrodos de estimulación (siendo C cátodo), registro (ES electrodo de succión) y tierra (T).
9. Colocación del Ganglio Cervical Superior para estudios in vitro
10. Disposición de las cámaras en el baño de incubación.
11. Detalle del equipo de regulación de oxigenación, temperatura y duración de trenes de estimulación
12. Diagrama del regulador semiautomático de trenes de estímulo
13. Equipo electrofisiológico para trabajo in vivo

14. Equipo electrofisiológico para trabajo in vitro
15. Respuesta umbral y máxima en el tronco simpático
16. Respuesta transináptica a la estimulación eléctrica en Ganglio Cervical Superior
17. Resultado del fraccionamiento de la fracción mitocondrial cruda, del Ganglio Cervical Superior en gradientes discontinuos de sacarosa
18. Microscopía electrónica fracción C (12,000 x) TN, terminales nerviosas
19. Microscopía electrónica fracción D (12,000 x) TN, terminales nerviosas, M, mitocondrias
20. Electroforesis en geles de acrilamida de las fracciones C y D
21. Incorporación de (^{32}P)-fosfato a proteínas totales del Ganglio Cervical Superior. Incubación en solución conteniendo el isótopo radioactivo durante 200 minutos
22. Incorporación de (^{32}P)-fosfato a proteínas totales del Ganglio Cervical Superior. Incubando en solución conteniendo el isótopo radioactivo durante los primeros 60 minutos
23. Incorporación de (^{32}P)-fosfato a proteínas presentes en las fracciones soluble y nuclear
24. Incorporación de (^{32}P)-fosfato a proteínas presentes en las fracciones C y D

25. Incorporación de (^{32}P)-fosfato a proteínas de la fracción C cuando el Ganglio Cervical Superior ha sido estimulado eléctricamente al tiempo cero en sus vías aferentes
26. Incorporación de (^{32}P)-fosfato a proteínas de la fracción D cuando el Ganglio Cervical Superior ha sido estimulado eléctricamente al tiempo cero en sus vías aferentes