

03068

3
24

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO



**Unidad Académica de los Ciclos Profesional y
de Posgrado del Colegio de Ciencias y
Humanidades**

INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS

**DISTRIBUCIÓN DE TERMINACIONES CON
NEUROTENSINA EN EL GANGLIO ESTELAR DEL GATO**

T E S I S

**QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRA EN CIENCIAS FISIOLÓGICAS**

presenta

ROXANA CARBÓ ZABALA

México, D.F.

1996

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

El presente trabajo de tesis se realizó en el laboratorio de Neuromorfología, bajo la dirección del Dr. MIGUEL ANGEL MORALES MENDOZA en el departamento de Biología Celular del Instituto de Investigaciones Biomédicas de la UNAM.

Durante la elaboración de este trabajo se recibió el apoyo de una beca de CONACYT (expediente N° 85751) y del proyecto PAPITT (IN204093) DGAPA, UNAM.

Participó en el desarrollo experimental de este trabajo la Q.F.B. Maria Elena Zetina Rosales, técnica académica del laboratorio del Dr. Morales.

ÍNDICE

	Página
RESUMEN	4
SUMMARY	5
INTRODUCCIÓN	6
HIPÓTESIS	15
PROPÓSITO Y OBJETIVOS	16
MATERIAL Y MÉTODOS.....	17
Protocolo general	17
Animales	17
Detección inmunohistoquímica de terminaciones con NT.....	18
Fijación y corte del tejido ganglionar	18
Técnica de inmunoperoxidasa.....	20
Marcaje retrógrado	20
Procesamiento de imágenes	22
Estadística	22
Autorradiografía.....	23
RESULTADOS.....	25
Localización y distribución de terminaciones IRNT	25
Localización y distribución de las neuronas ganglionares	30
Neuronas ganglionares con doble eferencia.....	34
Localización y distribución de receptores de NT.....	34
DISCUSIÓN	37
CONCLUSIONES	43
REFERENCIAS.....	44

RESUMEN

La transmisión de la información en el sistema nervioso (SN) se realiza a través de dos tipos de sinapsis: eléctrica y química. En esta última están involucradas sustancias conocidas como neurotransmisores, que releven la señal eléctrica. Los neurotransmisores pueden encargarse del relevo de la señal o de su modulación, como ocurre con la mayoría de los neuropéptidos. Estas sustancias transmisoras son capaces de provocar una respuesta fisiológica debido a su interacción con unas moléculas llamadas receptores, que se encuentran en la célula destinataria.

El sistema nervioso autónomo es la parte del SN que coordina las funciones viscerales involuntarias y se caracteriza por tener en su vía eferente sitios o sinapsis de relevo localizados en los ganglios autonómicos. En estas sinapsis ganglionares, al igual que en las otras regiones del SN, se presentan los efectos neuromodulatorios de los péptidos.

En este trabajo se estudió la participación de un neuropéptido, la neurotensina (NT), en la función ganglionar autónoma del ganglio estelar del gato. Este ganglio pertenece a la cadena paravertebral del sistema simpático autónomo y es responsable, entre otras acciones, de regular la función cardíaca. El propósito fundamental de este trabajo fue establecer una correlación morfofuncional entre la distribución de las terminaciones presinápticas que contienen NT (neurotensinérgicas) y las diferentes subpoblaciones de neuronas ganglionares principales. Para esto se determinaron: i) la distribución de las terminaciones presinápticas inmunoreactivas a NT (IRNT), ii) la organización de las neuronas ganglionares principales de acuerdo al órgano que inervan y iii) la localización de los receptores de NT. Como hipótesis se propuso que dada la función reguladora cardíaca de la NT, es de esperarse una correspondencia selectiva entre las terminaciones con NT, las células ganglionares cardioregulatoras y los receptores de NT.

Por medio de técnicas de inmunoperoxidasa se localizó a las terminaciones IRNT a través del tejido ganglionar y, con ayuda del procesamiento de imágenes, se determinó su distribución regional. Por otro lado, se utilizó marcaje retrógrado para determinar la localización y posible regionalización de las poblaciones de neuronas principales. Por último, se localizaron por medio de la técnica de autorradiografía con NT radiactiva, los receptores a ésta en el ganglio mencionado.

Los resultados obtenidos de los experimentos inmunohistoquímicos mostraron terminaciones IRNT en forma de una hilera de puntos en el neuropilo que se extienden en prácticamente todas las regiones del tejido ganglionar explorado, con una distribución heterogénea.

Con el marcaje retrógrado se encontró que en general las neuronas se agrupan en poblaciones según el nervio que conduce sus axones. Las marcadas por el nervio cardíaco (cardíacas) se localizaron en una amplia extensión del ganglio con un gradiente de mayor concentración a la salida del nervio. Las vertebrales, marcadas por el nervio del mismo nombre, en cambio, abarcan una franja homogénea desde la salida del nervio hasta el otro extremo del ganglio. El marcaje simultáneo por los dos nervios, permitió detectar una notoria población de neuronas con axones en ambas eferencias.

Los resultados de autorradiografía mostraron que los receptores de NT sólo se expresan en las neuronas principales si se ligan sus respectivos axones. No obstante la ligadura, los receptores son pocos y se encuentran principalmente en las células cercanas al nervio cardíaco.

El hallazgo de que las neuronas que envían sus axones por el nervio cardíaco se encuentran intercaladas con un número importante de terminaciones IRNT pudiera constituir el sustento morfológico de la acción cardioregulatora reportada para la NT, sin embargo, dada la presencia de estas mismas terminaciones cerca de las neuronas no cardíacas, deben también ser consideradas otras funciones reguladoras de la NT. La principal contribución de este estudio, por consiguiente, es mostrar una correlación morfofuncional de las terminaciones IRNT y las neuronas responsables de las diversas funciones ganglionares, tomándolo como base morfológica de la posible función de un determinado péptido, como fue en este caso la NT.

SUMMARY

Information in the nervous system (NS) is transmitted through two types of synapses: electrical and chemical. Involved in the latter are chemical substances known as neurotransmitters which relieve the electrical signal. Neurotransmitters are not only responsible for the relief but for its modulation as well, as occurs with most neuropeptides. These transmitters substances are capable of generating a physiological response due to their interaction with molecules named receptors, present in the target cell.

The autonomous nervous system is a part of the NS in charge of coordinating the visceral involuntary functions and is characterized by the presence of relief sites or synapses located in the autonomic ganglia. In these ganglionic synapses, as in other regions of the NS, the neuromodulatory effects of peptides can be observed.

The present study analyzes the participation of the neuropeptide neurotensin (NT) in the autonomic ganglionic function of the stellate ganglion of the cat. This ganglion belongs to the paravertebral chain of the autonomic nervous system and is responsible, among other things, for the regulation of cardiac function. The main purpose of this study was to establish a morphofunctional correlation between the distribution of NT-containing presynaptic terminals and the different subpopulations of ganglionic cells. For this we determined: i) the distribution of presynaptic immunoreactive terminals (NTIR), ii) the organization of the principal ganglionic neurons with respect to the organ they innervate and iii) the localization of NT receptors. The proposed hypothesis is that, considering the regulatory cardiac function of NT a selective correlation may be expected between NTIR terminals, cardioregulatory ganglionic cells and NT receptors.

By immunoperoxidase techniques we found that the NTIR terminals were spotted through the ganglionic tissue and, with image processing, their distribution was determined. On the other hand, retrograde tracing was used to determine the localization and regional distribution of the principal neuron populations. Finally, the receptors of NT in the mentioned ganglion were located by autoradiography with radioactive NT.

Results obtained in immunohistochemical experiments showed that NTIR terminals, like a line of black dots in the neuropil, are scattered in practically all regions of the explored ganglionic tissue, with heterogeneous distribution.

Retrograde tracing showed that, in general, neurons group together in subpopulations according to the nerve to which they send their axons. Those labeled by the cardiac nerve (cardiacs) were arranged all over the tissue, but a higher concentration gradient was observed near the exit of this nerve. On the other hand, the vertebral cells labeled by the nerve of the same name, are present in a homogeneous band from the exit of the nerve to the opposite extreme of the ganglion. Simultaneous labeling by both nerves allowed us to detect an evident population of neurons with axons in both efferences.

Autoradiography results showed that NT receptors are only expressed in principal neurons if their axons are linked. In spite of this linkage, receptors are few and they are mainly found in cells close to the cardiac nerve.

The observation that the neurons which send their axons through the cardiac nerve are intermingled with a considerable number of NTIR terminals may support the morphological basis for the cardioregulation action reported for the NT, however since these terminals are also present in non-cardiac neurons, further regulatory functions of NT must be considered. The main contribution of this study, therefore, is to show the morphofunctional correlation of NTIR terminals and neurons responsible for various ganglionic functions, taking it as a morphological basis of the function of a given peptide, as is NT.

INTRODUCCIÓN

La comunicación entre células es crucial para la supervivencia y función de un organismo pluricelular. Las neuronas utilizan la transmisión sináptica para formar intrincados patrones esenciales para el buen funcionamiento del sistema nervioso; tan es así, que durante el desarrollo del cerebro se forman las conexiones necesarias para que las células participen en distintos eventos, tales como la percepción sensorial o el aprendizaje. Cuando existen errores en la transmisión, se manifiestan diversas patologías como pueden ser la enfermedad de Parkinson, la depresión, etc. (Jessell y Kandel, 1993). Las neuronas tienen como propiedad distintiva la comunicación entre ellas, es decir, transmitirse señales biológicas a través de zonas especializadas de acercamiento neuronal conocidas como sinapsis. Las neuronas poseen dos tipos de sinapsis y señales, eléctricas y químicas. En este trabajo nos referiremos a las últimas.

En las sinapsis químicas se distinguen tres componentes; el elemento o terminación presináptica, la membrana postsináptica y la señal (figura 1). Al llegar el impulso nervioso en forma de señal eléctrica a la terminación presináptica la despolariza, lo que desencadena una serie de eventos dependientes de Ca^{++} que terminan con la liberación de sustancias bioactivas, denominadas neurotransmisores, una vez liberadas las sustancias actúan sobre proteínas específicas de la membrana postsináptica conocidas como proteínas receptoras o simplemente receptores, el acople neurotransmisor-receptor dispara otra secuencia de eventos que culminarán en la regeneración o inhibición del impulso o señal eléctrica en la neurona subsiguiente (Kandel, Seigelbaum y Schwartz, 1991).

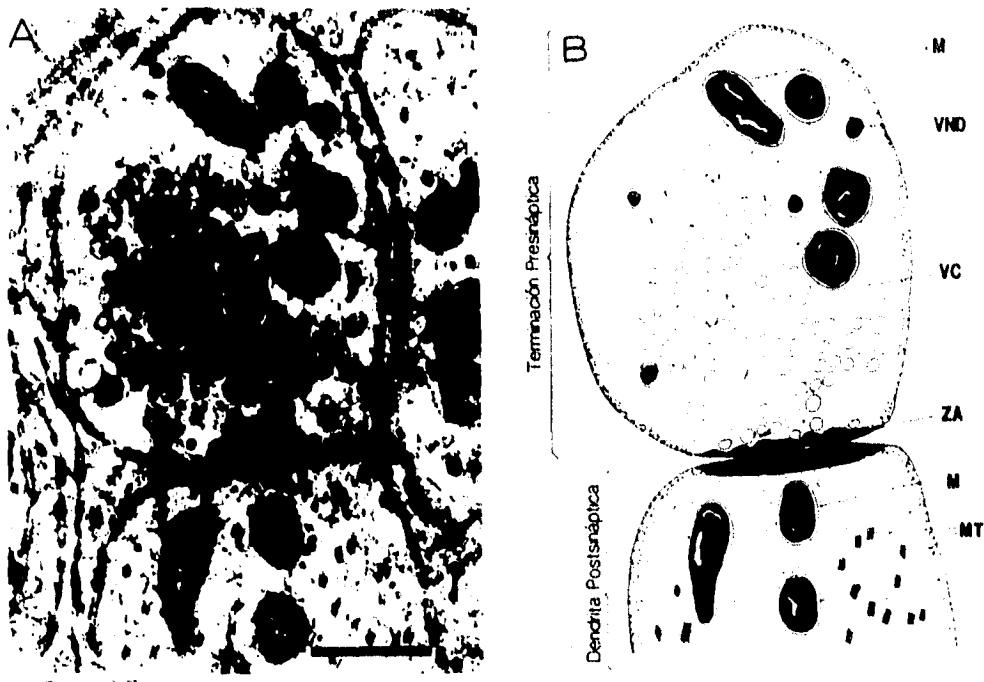


Figura 1. Sinapsis. **A:** Micrografía de una sinapsis axo-dendrítica en el ganglio cervical superior del gato (calibración: 0.5 μ m). **B:** Esquema de la micrografía de **A** donde se representa el axón (elemento presináptico) y la dendrita (elemento postsináptico) con sus elementos intracelulares. M=mitocondria; VND=vesículas de núcleo denso; VC=vesículas claras; ZA=zona activa y MT= microtúbulos.

En la transmisión química de las señales sinápticas se sabe que participan, además de los transmisores principales o clásicos que son los encargados del relevo de la señal, otros transmisores conocidos como cotransmisores que también se liberan al estimular las terminaciones presinápticas y regulan o modulan el efecto de los transmisores clásicos (Kupfermann, 1991). En esta tesis se estudia la distribución celular de un cotransmisor, el péptido neurotensina (NT), en el ganglio estelar del gato, cuya función neuromoduladora ha sido ya reportada en varias regiones del sistema nervioso, incluido el periférico autónomo, en donde, entre otras cosas, se sabe modula la regulación cardíaca simpática (Bachoo y Polosa, 1988). Con base a esta

función de cardioregulación de la NT, en este trabajo se trata, de determinar si las terminaciones que contienen este péptido muestran algún patrón específico de distribución que se correlacione con la función moduladora que ejerce.

En lo que sigue se revisará brevemente los conceptos básicos sobre sinapsis, la transmisión y la cotransmisión; y de manera particular lo concerniente a la sinapsis de los ganglios autonómicos que fueron las estructuras neuronales donde se realizó este estudio.

Sinapsis.- Los elementos que conforman las sinapsis químicas se pueden dividir en pre y postsinápticos. El componente presináptico lo pueden formar las terminaciones de los axones o las dendritas, mientras que el postsináptico pueden ser axones (sinapsis axoaxónicas), dendritas (sinapsis axodendríticas o dendrodendríticas) o somas (sinapsis axosomáticas o dendrosomáticas) (Kandel, et al.1991). Las terminaciones presinápticas poseen elementos distribuidos en dos zonas o dominios, el vesicular y el mitocondrial. En el primero se encuentran las vesículas claras (40 a 60 nm) que contienen al transmisor clásico o mediador químico encargado del paso o inhibición de los impulsos de una neurona a otra. Este dominio tiene también una región membranal especializada llamada zona activa, formada por material electrodense, por donde se libera el transmisor clásico. El dominio mitocondrial alberga mitocondrias, microtúbulos, neurofilamentos, retículo endoplásmico y vesículas de núcleo denso (VND) (90 a 120 nm) en las que se propone que se almacenan los cotransmisores, junto con unas proteínas llamadas cromograninas (Gotow, 1992). La parte postsináptica, como antes se mencionó, la pueden constituir somas, dendritas o

cotransmisores, junto con unas proteínas llamadas cromograninas (Gotow, 1992). La parte postsináptica, como antes se mencionó, la pueden constituir somas, dendritas o axones. La membrana postsináptica tiene una acumulación de un material denso en la cara citoplasmática, exactamente opuesto a la zona activa de la parte presináptica, denominado densidad postsináptica (figura 1).

Otros componentes importantes en la parte postsináptica y responsables de la recepción de la señal química, son las proteínas conocidas como receptores. Las sustancias neurotransmisoras (Nts), tanto clásicos como cotransmisores, actúan sobre estos receptores. La función de los receptores es esencialmente discriminar entre los diferentes ligandos y potenciar la señal apropiada (Burbach y Meijer, 1992).

Cotransmisión.- De las diversas sustancias identificadas como cotransmisores, los péptidos constituyen el grupo más conocido (Hökfelt, 1991). Los neuropéptidos son moléculas formadas por cadenas cortas de 3 a 60 aminoácidos sintetizados en el soma neuronal. Estos péptidos se almacenan en las VND, donde pueden aparecer coalmacenados con transmisores clásicos o con otros neuropéptidos (Hökfelt, 1991; Elfvin, Lindh y Hökfelt, 1993; Zhang, Nicholas y Hökfelt, 1993). Su liberación requiere de estímulos de alta frecuencia, por lo general y a diferencia de los Nts clásicos se liberan en la periferia de la zona activa presináptica, ya liberados pueden ejercer efectos tanto sobre las neuronas como sobre células gliales, músculos, glándulas y vasos sanguíneos (Thureson-Klein y Klein, 1990; Weldon, Bachoo, Morales, Collier y Polosa, 1993; Bean, Zhang y Hökfelt, 1994).

general, no participan directamente en el relevo del impulso, sino que regulan o modulan la transmisión (Hökfelt, 1991). Sin embargo existen algunas moléculas de origen peptídico, como la hormona TRH, las encefalinas y la vasopresina entre otras, que actúan también como transmisores clásicos (Snyder, 1980). Los receptores de los péptidos son en general del tipo de acoplados a proteínas G, que actúan por segundos mensajeros.

La abundante literatura sobre la localización de los neuropéptidos, tanto en sistema nervioso central como periférico, contrasta con la información que existe sobre sus funciones y mecanismos moduladores de la transmisión. Poco se sabe sobre el papel de los péptidos en la regulación integrativa o sistémica de los diferentes núcleos que los contienen. Tal es el caso del ganglio autonómico donde se han encontrado varios péptidos (Heym, Reinecke, Weihe y Torssmann, 1984; Bachoo, Ciriello y Polosa, 1987; Morales, Holmberg, Xu, Cozzari, Hartman, Emson, Goldstein, Elfvín y Hökfelt, 1995) cuya participación en la regulación autonómica no es del todo clara. De uno de estos péptidos, la neurotensina, se sabe que su aplicación exógena induce una facilitación de la transmisión ganglionar (Bachoo y Polosa, 1988).

Ganglio autonómico.- Los ganglios autonómicos son estructuras encargadas de relevar la información eferente visceral motora (figura 2). Este relevo se da en la sinapsis que se establece entre las terminaciones axónicas de las neuronas preganglionares, cuyos somas se localizan en las astas intermediolaterales de la

médula espinal, y las dendritas y somas de las neuronas postganglionares¹ las cuales mandan sus axones hacia los órganos blanco (vísceras de músculo liso y al corazón) (Redgate, 1993). Se ha sugerido que la población neuronal ganglionar esta organizada en grupos o poblaciones de acuerdo a los órganos a los que inervan; de esta manera, por ejemplo las neuronas se agrupan cerca de la salida por donde mandan sus axones (Purves, 1975; Dail y Barton, 1983).

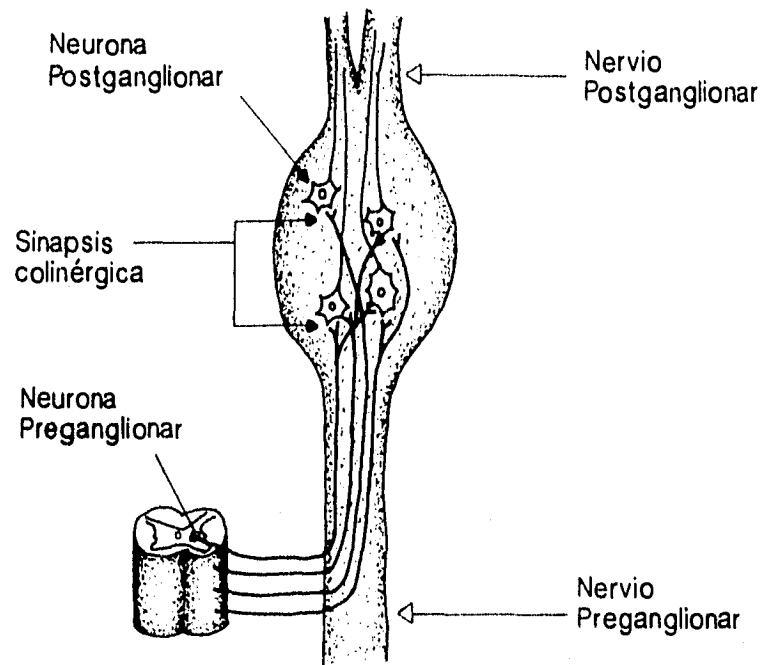


Figura 2. Esquema del ganglio autónomo. Se muestran las aferencias y las eferencias, así como el tipo farmacológico de sinapsis característica del ganglio.

¹ Estrictamente, este término es erróneo; deben ser llamadas ganglionares, ya que conforman al ganglio, pero se usa este termino para diferenciarlas de las preganglionares.

Con respecto a la organización de las neuronas ganglionares, uno de los hallazgos recientes es que subpoblaciones específicas de neuronas, en parte codificadas químicamente, están relacionadas con destinatarios específicos (Gibbins, 1992). Estos grupos de neuronas parecen estar también relacionados de manera directa con redes de terminaciones aferentes, dando lugar a arcos reflejos locales, que aparentemente pueden operar con muy poco o sin control central y con alto grado de especificidad (Elfvín, et al. 1993).

En los ganglios autonómicos, como en otras regiones del SN, se ha demostrado la presencia de diferentes péptidos tales como la neurotensina NT, la leucina-encefalina (Leu-Enk), la sustancia P (SP), la somatostatina (SS), el péptido intestinal vasoactivo (VIP) y el factor liberador de la corticotropina (CRF) (Bachoo, et al. 1987; Heym, et al. 1984).

Uno de los ganglios simpáticos paravertebrales más estudiado es el estelar; este ganglio se encuentra bilateralmente a ambos lados de la columna vertebral y se le localiza sobre la pleura debajo de la segunda costilla (figura 3). Sus aferencias, que vienen de las ramas torácicas blancas T₁, T₂, T₃ y T₄ y sus eferencias, formadas por el nervio cardíaco, el ansa subclavia y el nervio vertebral, resultan claramente distinguibles cuando se expone el ganglio (Pardini y Wurster, 1984). En el gato las neuronas de este ganglio, primordialmente y a través del nervio cardíaco regulan el ritmo cardíaco, además de inervar a los pulmones y la tráquea; por la otra eferencia, el nervio vertebral, también regulan la presión sanguínea de las extremidades superiores (Mckibben y Getty, 1968; Phillips, Randall y Armour, 1986).

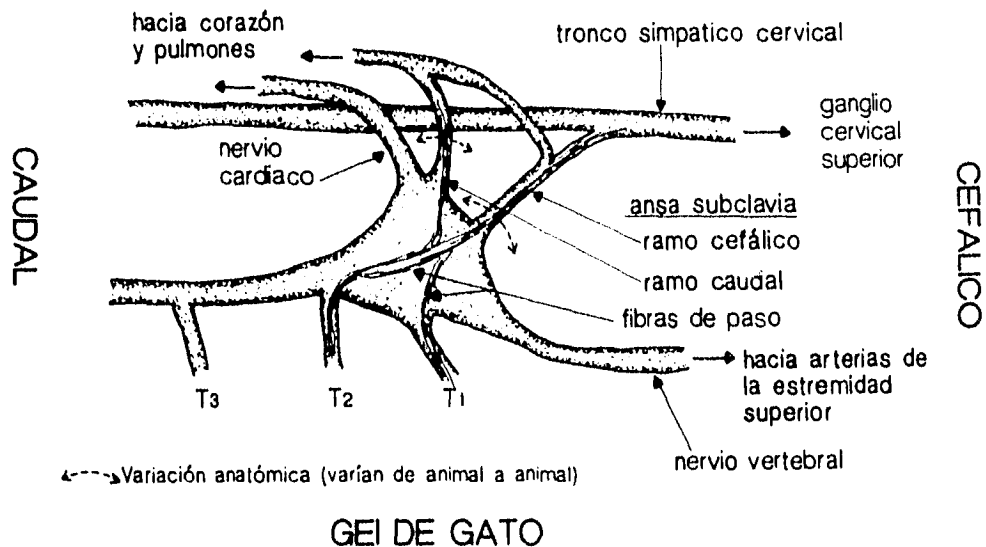


Figura 3. Esquema obtenido de un ganglio estelar izquierdo (GEI) de gato. Se muestran las aferencias (T₁, T₂ y T₃) y eferencias (nervios cardíaco, vertebral y ansas subclavias) del ganglio, así como los destinos de los nervios eferentes.

Como ya se dijo al principio de esta introducción, en este trabajo se analizó la presencia y distribución local de la NT en el ganglio estelar del gato. La NT es un péptido de 13 aminoácidos con potente actividad hipotensiva, hipoglucémica y visceral contráctil (Carraway y Leeman, 1973; 1975; Leeman y Carraway, 1982). En el sistema nervioso simpático, la NT se comporta como sustancia excitadora e interactúa con los receptores de células de músculo liso y al parecer con el cardíaco en el ganglio estelar (Rioux, Kérouac y Quirion, 1982).

La NT se ha encontrado en el soma (Krukoff, Ciriello y Calaresu, 1985) y terminaciones axónicas (Lundberg, Rökaeus, Hökfelt, Rosell, Brow y Goldstein, 1982;

Bachoo, et al. 1987; Heym et al. 1984) de las neuronas preganglionares simpáticas. En el ganglio estelar del gato, Morales y colaboradores (Morales, Bachoo, Beaudet, Collier y Polosa, 1993) encontraron que no todas las terminaciones axónicas contienen NT, sino que su presencia esta restringida a una subpoblación de dichos botones.

Los receptores a la NT, así como su ADNc ya han sido aislados y clonados, y se ha observado que son del tipo de receptores glucosilados acoplados a mecanismos de segundos mensajeros (proteínas G), formados por siete regiones transmembranales, que interactúan con ciertos aminoácidos de la molécula de la NT (Tanaka, Masu y Nakanishi, 1990). Después de varios estudios se ha logrado dilucidar que existen dos receptores de NT: los de clase 1 que son de alta afinidad y de baja capacidad (en ratón), y los de clase 2 que son de baja afinidad y de alta capacidad (en becerro) (Tanaka, et al. 1990; Watson, Isackson, Makker, Yamada, Yamada, Cusak y Richelson, 1993). Por otra parte se ha observado también que estos receptores de NT son internalizados, junto con la NT, por las neuronas formando cúmulos cerca del núcleo (Beaudet, Mazella, Nouel, Chabry, Castel, Laduron, Kitabgi y Faure, 1994).

En esta tesis, se investigó, si las terminaciones que contienen NT muestran alguna selectividad topográfica que obedezca a la organización regional de las neuronas ganglionares, es decir, si se encuentran más de estas terminaciones cercanas a un grupo definido de neuronas encargadas de una determinada regulación autonómica. De manera complementaria, se investigó también si las neuronas ganglionares se agrupan en núcleos según la eferencia por donde envían sus axones y finalmente, se exploró la localización de receptores de NT en este tejido.

HIPÓTESIS

Dada la función cardioreguladora conocida de la neurotensina, así como su distribución restringida a una subpoblación de terminaciones preganglionares en el ganglio estelar del gato, es de esperarse que dichas terminaciones con NT sigan un patrón de organización topográfica acorde a la localización de las células ganglionares involucradas en la cardioregulación. Así mismo se espera que estas neuronas cardioreguladoras sean las que expresen de manera preferencial receptores a este péptido.

PROPÓSITO Y OBJETIVOS

El propósito del presente trabajo es investigar si la distribución de las terminaciones preganglionares que contienen NT en el ganglio estelar del gato muestran alguna selectividad en su organización y si ésta obedece a la localización de las neuronas ganglionares principales. Se analizará también, si estas neuronas expresan receptores de NT. Para cumplir este propósito se plantean los siguientes objetivos:

1. Detectar las terminaciones que contienen NT y analizar su distribución.
2. Identificar la localización de las neuronas ganglionares principales según la vía eferente por donde envían sus axones.
3. Explorar la relación topográfica de las terminaciones que contienen NT con la población de neuronas ganglionares principales.
4. Detectar la presencia y localización celular de receptores de NT, así como la distribución de las neuronas que los expresan.

MATERIAL Y MÉTODOS

Protocolo general

El estudio se dividió en tres partes: a) marcaje inmunocitoquímico y distribución de terminaciones con NT, b) marcaje retrógrado y distribución de neuronas ganglionares y c) detección por autorradiografía de receptores de NT. Para la primera parte se usaron 6 ganglios estelares, los cuales después de ser inmunomarcados para NT, se analizaron por un sistema de procesamiento de imágenes, para obtener la distribución de las terminaciones inmunodetectadas con NT. La segunda parte se realizó en 6 ganglios estelares a los que se les aplicaron fluorocromos, a través de sus nervios eferentes, para que por transporte axónico retrógrado, se marcaran las neuronas ganglionares; de esta manera se pudo identificar la localización de las neuronas. Finalmente los experimentos de autorradiografía se hicieron en 9 ganglios, se usó NT marcada con ^{125}I como agonista para detectar a los receptores y también se hizo un mapa de las neuronas que expresan receptores de NT. A continuación se describen las metodologías empleadas:

Animales

Se utilizaron gatos adultos de uno u otro sexo entre 2.5 y 4.5 kg., los cuales se anestesiaron profundamente con pentobarbital sódico (35 mg/kg., i.p.) para los casos agudos. Para los experimentos crónicos se usó la misma anestesia, además de que se mantuvieron con dosis complementarias (3 mg/kg./h, i.v.) y se entubaron ortotraquealmente. Los gatos se ventilaban artificialmente después de una parálisis

con bromuro de pancuronium (100 µg/kg. i.v.) con suplementos de otros 100 µg/kg. cada 2 o 3 horas, cuando el efecto de la dosis previa pasara. En la vena femoral se colocó un catéter para la administración de las drogas necesarias. Al terminar la cirugía se dejó a los animales en recuperación, con sus debidos cuidados, incluido analgésicos y antibióticos, hasta que se volvían a intervenir.

Detección inmunohistoquímica de terminaciones con NT

Fijación y corte del tejido ganglionar

Los animales se anestesiaron para los experimentos agudos como ya se mencionó. Los ganglios se fijaron *in situ* a través de una perfusión transcardíaca con 500 ml de una solución de perfusión (amortiguador de fosfatos (PB) 0.01 M, NaCl 0.8%, KCl 0.025% y NaHCO₃ 0.05% pH 7.4 a 4 °C), por 3 minutos, a una velocidad de 200 ml/min., seguida de 300 ml de otra solución fijadora ((PB) 0.1 M, pH 7.4 a 4 °C con 4% de paraformaldehído) por 3 minutos más a la misma velocidad, y de otros 700 ml de esta última, pero a velocidad diez veces menor (20 ml/min.) por 50 minutos. Después de la perfusión, se removieron las dos primeras costillas, se localizaron los ganglios estelares (GE) y se extrajeron del gato, se liberaron de su cápsula de tejido conectivo para luego pasarlos a la solución fijadora por 4 hr conservándose a 4 °C; finalmente como crioprotección se pasaron a una solución de sacarosa al 30% en un amortiguador de fosfatos salino (PBS) por otras 24 hr.

De la solución de sacarosa, los ganglios se colocaron en medio de inclusión para tejido congelado (Tissue-Tek) y se pusieron a congelar a -20°C en un crióstato.

Se obtuvieron cortes longitudinales de 10 μm de grosor que se recogieron en laminillas cubiertas de gelatina formando una serie representativa de todo el ganglio. Ya que el ganglio estelar mide entre 1,600 y 2,000 μm de grosor, para lograr esta representatividad, se tomaron cuatro cortes, uno cada 400 μm (figura 4). Los cortes se procesaron según la siguiente técnica de inmunoperoxidasa.

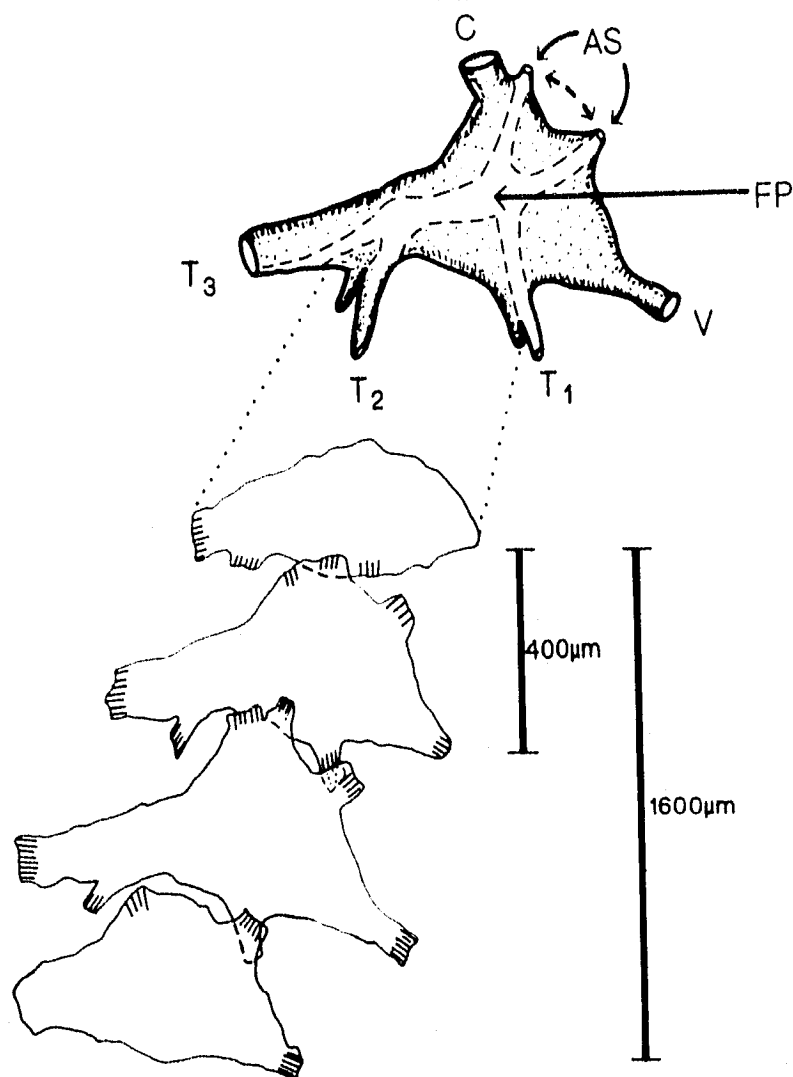


Figura 4. Esquema que representa la seriación de cortes longitudinales del ganglio estelar del gato obtenidos en el crióstato. Los cortes fueron de 10 μm de grosor; de los 160 cortes que abarcaron los 1600 μm de ancho del ganglio, se colectaron cuatro representativos, uno cada 400 μm .

Técnica de inmunoperoxidasa

Los cortes se lavaron para eliminar los restos del medio de inclusión con PBS (0.01M) con tritón X-100 al 0.3% (PBS-TX); con esta solución se realizaron todas las diluciones y los lavados. Después se incubaron con un anticuerpo primario policlonal de conejo contra NT (Incstar, 1:1000) por 24 hr a 4 °C. Se hicieron dos lavados y se aplicó un segundo anticuerpo IgG monoclonal biespecífico de rata, que presenta un doble reconocimiento antigénico a la IgG de conejo y a la peroxidasa (Medicorp, 1:1000; Kenigsberg, Semenenko y Cuello, 1990) por 90 minutos a temperatura ambiente. Se repitieron dos lavados y se incubaron con una solución de peroxidasa (HRP) 5µg/ml por 45 minutos. A continuación se lavaron otra vez cuatro veces y se incubaron con una solución de diaminobenzidina (DAB) al 0.05% por 6 minutos. Para revelar, se les añadió una solución de peróxido de hidrógeno (H₂O₂) al 0.01% por 8 minutos. Por último se lavaron con PBS-TX y luego con PB 0.1M, pH 7.4. Se deshidrataron en concentraciones ascendentes de alcohol, con un paso final de xileno para montarse con medio de montaje (Permout). Los cortes se observaron por microscopía de luz. Paralelamente se realizaron cortes control, los que se incubaron con el amortiguador sin anticuerpo primario.

Marcaje Retrógrado

En seis animales y según la técnica para experimentos crónicos antes mencionada, se expuso uno de los ganglios estelares, como se señaló en la técnica de fijación; luego se seccionó uno de los nervios eferentes del ganglio (en tres experimentos el cardíaco y en los otros tres el vertebral) a 4 o 5 mm de su salida y se introdujo en un tubo de

polietileno (2 mm de diámetro interno) sellado por un extremo. El tubo se llenó previamente con el marcador (*fluorogold* o HRP) al 3%, y se mantuvo ahí por 45 min. Posteriormente, se retiraron los tubos, se cerraron las heridas y se dejó que se recuperara el animal, con sus debidos cuidados. En algunos experimentos, el marcaje retrógrado se realizó con soluciones de *fast blue* y de *fluorogold* (3%), simultáneamente por los dos nervios. Cuarenta y ocho horas después de la operación se perfundi6 para fijar al animal y se extrajeron los ganglios, con el método antes mencionado. De estos ganglios, previamente crioprottegidos con sacarosa, se obtuvieron cortes de 20 µm de grosor que se recogieron en laminillas cubiertas de gelatina, tomando cuatro cortes representativos, uno cada 400 µm. Después se cubrieron con el medio de montaje Aquamount. Se observaron con un microscopio Nikon equipado con epifluorescencia con un filtro Nikon UV-1A (excitación 365/10, barrera de 400).

En otros experimentos adicionales y para poder observar simultáneamente las neuronas y las terminaciones inmunoreactivas a NT (IRNT), se realizó un doble marcaje con HRP, inmunohistoquímico y de aplicación retrógrada; cuando la HRP se aplicó retrógradamente se reveló como se mencionó anteriormente con DAB sin intensificadores, dando un color café rojizo, mientras que la inmunoperoxidasa contra NT se reveló con DAB y los intensificadores (cloruro de cobalto 1% y sulfato amonio de níquel 1%), dando un color azul obscuro.

Procesamiento de Imágenes

Las laminillas se analizaron por medio de un sistema de procesamiento de imágenes Histoscan.X (Biocom, Francia) a un aumento de 10X (Corkidi, 1989; Hirsch, Lejeune, Colliot, Corkidi y Tajani, 1992). Con este sistema se delimitaron los perfiles de los cortes, se señalaron todas las terminaciones inmunoreactivas a NT, así como las neuronas marcadas retrógradamente y se calculó el número de las terminaciones y de las células a través de todo el tejido, así como en zonas predeterminadas. Por otro lado, se construyeron mapas paramétricos en los que se puede observar la distribución de densidades (densidades espaciales asociadas a un color) de las terminaciones y las células. Para establecer la relevancia morfofuncional de la distribución de terminaciones IRNT y de las células ganglionares marcadas, se dividió toda el área de cada corte de los ganglios en cuatro regiones, que abarcaron el 25% cada una y se circunscribieron a las dos aferencias principales, ramos comunicantes blancos torácicos 3 y 2 (T₃ y T₂); zonas A y B respectivamente, y a las dos eferencias, nervio vertebral (zona C) y el nervio cardíaco (zona D) (figura 7).

Estadística

La cantidad de terminales IRNT y de células marcadas se expresaron como porcentajes de terminales o células en cada corte ganglionar. El análisis estadístico usado fue una ANOVA de dos vías, seguido de una ANOVA de una vía mas una prueba de Tukey *post hoc*, con una $p < 0.05$ como nivel de significancia. Los datos se expresaron como las medias \pm el error estándar.

Autorradiografía

Para la localización de los receptores de neurotensina, se utilizó la siguiente técnica de autorradiografía (Hamel y Beudet, 1987).

Ya anestesiado el animal, según la técnica para experimentos crónicos ya mencionada, se conectó a respiración artificial para luego exponer los ganglios estelares, como se especificó anteriormente. Se extrajeron los ganglios e inmediatamente se colocaron en nitrógeno líquido, cuando se requirió se almacenaron a -70°C , después se obtuvieron cortes de $15\mu\text{m}$ en el crióstato a -20°C . Los cortes se pusieron en contacto con la NT marcada con yodo radiactivo (^{125}I -NT) 1 nM diluida en tris-HCl 0.05 M y sacarosa 0.25 M, pH 7.4 por 20 minutos a temperatura ambiente, se lavó el exceso con PB 0.12 M, pH 7.4 fresco a 4°C y se postfijaron en un PB 0.05 M pH 7.4 con glutaraldehído al 4%, a 4°C , por 1 hr.

Los cortes se deshidrataron, se sumergieron en una emulsión fotográfica (emulsión nuclear NTB-2 de Kodak) y se escurrieron para ser colocados en una caja oscura por seis semanas. Después de ese tiempo se extrajeron en oscuridad para revelarse en D-19, se fijaron en una solución de tiosulfato de sodio al 30% y se contrastaron con azul de toluidina. Después se observaron en el microscopio de luz, a campo oscuro, para detectar sitios de pegado de la NT radiactiva. Como control se usaron laminillas preincubadas con concentraciones 100 veces mayor de NT fría (sin ^{125}I). Dado que con los resultados obtenidos mediante esta técnica no se encontraron receptores de NT, se decidió por medio del ligado de los axones de las neuronas

ganglionares, inducir una acumulación de receptores en los somas, para así tener mayor posibilidad de detectarlos.

Dada la poca cantidad de neuronas que mostraron receptores de NT, su distribución fue determinada, visualmente sin requerir del procesador de imágenes. Finalmente, con esta observación se elaboraron mapas de la distribución de las neuronas ganglionares que presentaron reacción positiva a la ^{125}I -NT.

Para este segundo ensayo de autorradiografía, se utilizaron tres animales para cada uno de los métodos que se mencionarán a continuación y se sometieron a los siguientes tratamientos antes de proseguir con la técnica de autorradiografía recién descrita. Además de ligar los axones postganglionares, en algunos experimentos se ligaron los axones aferentes preganglionares con el propósito de detectar, por la misma mecánica de acumulación por ligadura axonal, la posible presencia de receptores de NT presinápticos. Los gatos se anestesiaron, como anteriormente se mencionó para los experimentos crónicos, y se conectaron a respiración artificial, luego se expusieron los ganglios y se le ligó indistintamente el tronco aferente T₃ (n=3), el nervio eferente cardíaco (n=3) o el nervio eferente vertebral (n=3). Posteriormente, se retiraron los tubos de respiración, se cerraron las heridas y se dejó que se recuperara el animal por 24 hr, con los cuidados pertinentes. Pasado este tiempo, se volvió a anestesiar al animal y los ganglios se procesaron con la técnica de autorradiografía arriba mencionada.

RESULTADOS

Localización y distribución de terminaciones inmunoreactivas a NT (IRNT)

La inmunoreactividad se encontró como una conspicua marca en forma de puntos negros ampliamente distribuida, a través de todo el ganglio. Esta marca se limitó al neuropilo, sin encontrarse en el pericarion. Anteriormente se ha mostrado que esta marca en forma de puntos corresponde a los botones o terminales axónicas preganglionares marcadas (Morales, et al. 1993) (figura 5).

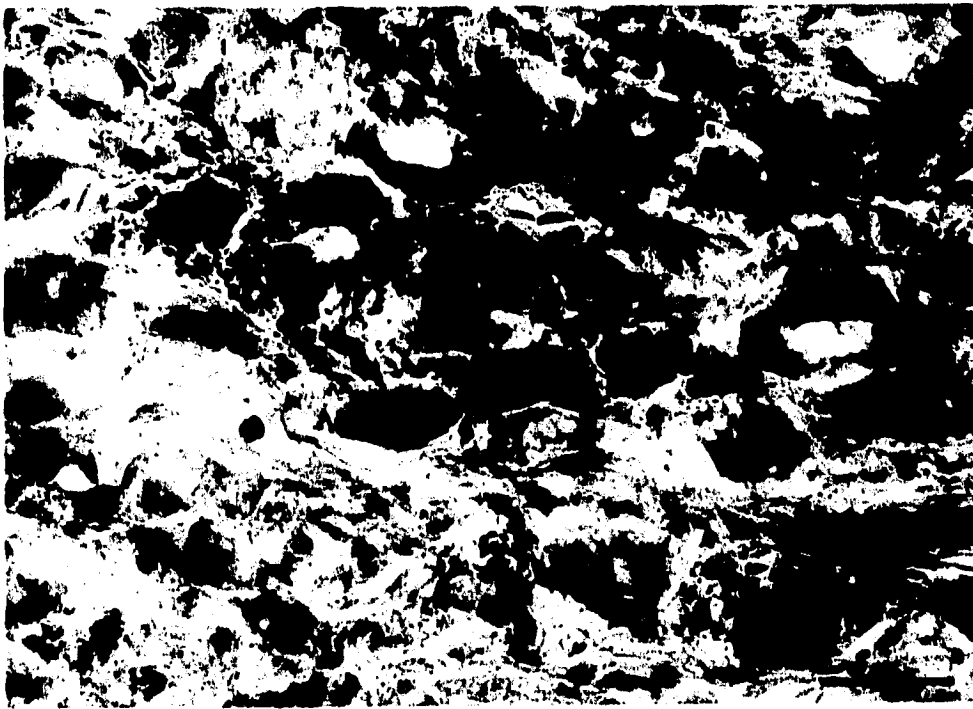


Figura 5. Fotomicrografía de campo claro de un corte de 10 μm del ganglio estelar del gato con terminaciones IRNT. En el neuropilo del ganglio las terminaciones preganglionares se notan claramente marcadas como puntos negros alrededor de las células. Calibración: 50 μm .

En cada corte de 10 μm de grosor explorado se encontró alrededor de 5,000 terminaciones IRNT, considerando que los cortes se obtuvieron sobre el eje lateral de

los ganglios, que mide 1600 μm , cada ganglio daría lugar a un total de 160 cortes; lo que daría una cantidad total de 800,000 terminaciones IRNT. Los datos del total de terminaciones en el ganglio simpático de mamífero reportados son de 4 a 8 millones (Siklós, Párducz, Halász, Rickmann, Joó y Wolff, 1990), lo que indicaría que, en este ganglio, aproximadamente un 10% de las terminaciones contienen NT.

Aunque las terminaciones IRNT se encontraron en toda el área del ganglio, la distribución resultó heterogénea, ya que se observó un claro cúmulo, localizado en las regiones cercanas a las entradas de T₃ y T₂ (área con parte de las zonas A y B). Las terminaciones IRNT se encontraron en mayor porcentaje en la región de T₂ ($31.1 \pm 1.7\%$), con las regiones T₃ y la del nervio vertebral semejantes (25.6 ± 2.8 y $24.6 \pm 2.0\%$ respectivamente) y la región del cardíaco con menor porcentaje de terminaciones ($15.2 \pm 1.3\%$). En las figuras 6 y 7, se puede distinguir esta distribución heterogénea de las terminaciones IRNT, en la primera se muestra la distribución en toda el área de un corte representativo del ganglio y en la otra se muestra un ejemplo de las imágenes paramétricas que se construyen con el programa de procesamiento de imágenes. La estimación cuantitativa y su significancia estadística se muestra en la figura 8. En la figura 9 se muestra la combinación del doble marcaje con HRP, retrógrado (somas neuronales) e inmunohistoquímico (terminales IRNT), donde se puede apreciar la diferente concentración de terminaciones IRNT, según la zona ganglionar observada.

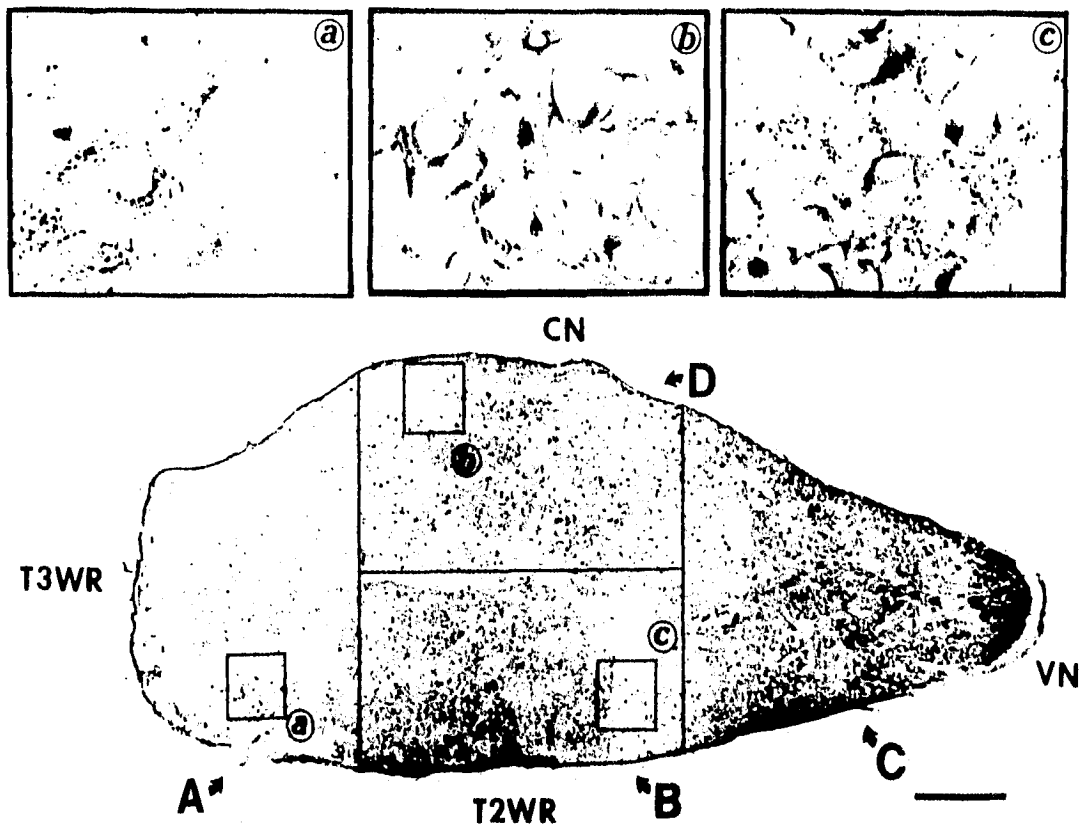


Figura 6. Corte longitudinal de 10 μm de grosor del ganglio estelar inmunoteñido contra NT. Fotomicrografía de un mapa de poco aumento ilustrando la regionalización de las terminaciones IRNT a través de todo el ganglio. El área total de cada corte se dividió en cuatro regiones, de la A a la D donde cada una abarca el 25% más próximo a las dos grandes aferencias: la región cercana a T₃, (ramo comunicante blanco torácico 3, T3WR) (zona A), a T₂ (ramo comunicante blanco torácico 2, T2WR) (zona B), y las dos grandes eferencias nervios cardíaco (CN) (zona D) y nervio (VN) (zona C). a, b y c son proyecciones aumentadas de los marcos en las áreas del corte y donde se muestra la distribución heterogénea de las terminales IRNT en estas regiones. Calibración: 150 μm en el mapa y 15 μm en los recuadros.



Figura 7. Imagen paramétrica de la distribución y densidad de las terminaciones IRNT en una serie de 4 cortes longitudinales del ganglio estelar. Los colores representan la densidad de las terminaciones según la siguiente graduación: negro < violeta < azul < verde < amarillo < rojo. El área total de cada corte se dividió en cuatro regiones, de la A a la D donde cada una abarca el 25% más próximo a alguna de las aferencias y eferencias del ganglio: la región cercana a T₃ o ramo comunicante blanco torácico 3 (zona A), a T₂ o ramo comunicante blanco torácico 2 (zona B), al nervio vertebral (zona C) y al nervio cardíaco (zona D).

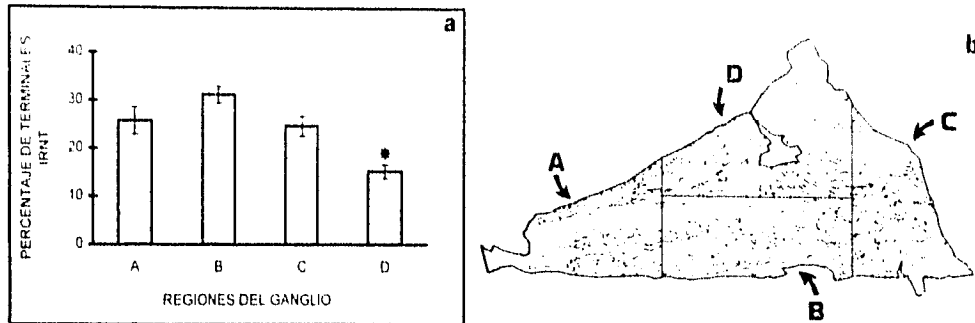


Figura 8. Resultados cuantitativos del experimento de terminaciones IRNT. *a*: Gráfica de barras del porcentaje de IRNT en el ganglio estelar del gato. Se muestra el porcentaje de terminaciones IRNT encontradas en las cuatro regiones del ganglio, cada región cubre el 25% del área total de cada corte examinado, y se circunscriben a las aferencias y eferencias del ganglio; zona *A*: ramo comunicante blanco torácico 3 (T_3), zona *B*: ramo comunicante blanco torácico 2 (T_2), zona *C*: nervio vertebral y la zona *D*: nervio cardíaco. Sólo la zona *D* (asterisco) tiene un porcentaje significativamente menor de terminaciones IRNT ($F=10.22$; $p<0.05$). *b*: Representación esquemática de un mapa de distribución de las terminaciones IRNT, obtenida por el procesamiento de imágenes, en las cuatro zonas.



Figura 9. Fotomicrografías de $10\ \mu\text{m}$ de grosor mostrando las neuronas marcadas retrógradamente y las terminales IRNT. *a*: células marcadas retrógradamente de la parte ventromedial o región *D*, donde se pueden observar algunas terminaciones cerca de las células. *b*: células marcadas retrógradamente de la parte craneal o región *C* con más terminales IRNT cercanas. Calibración : $100\ \mu\text{m}$.

Localización y distribución de las neuronas ganglionares

Con los marcadores aplicados retrógradamente en las eferencias del ganglio, se identificaron las neuronas ganglionares principales, las cuales, al igual que la descripción de Cajal (1911) y De Castro (1932) y más recientemente de Mo y colaboradores (Mo, Wallis y Watson, 1994), mostraron ser multipolares, con soma esférico de 30 a 50 μm de diámetro y dendritas largas de hasta 120 μm de longitud (figura 10).

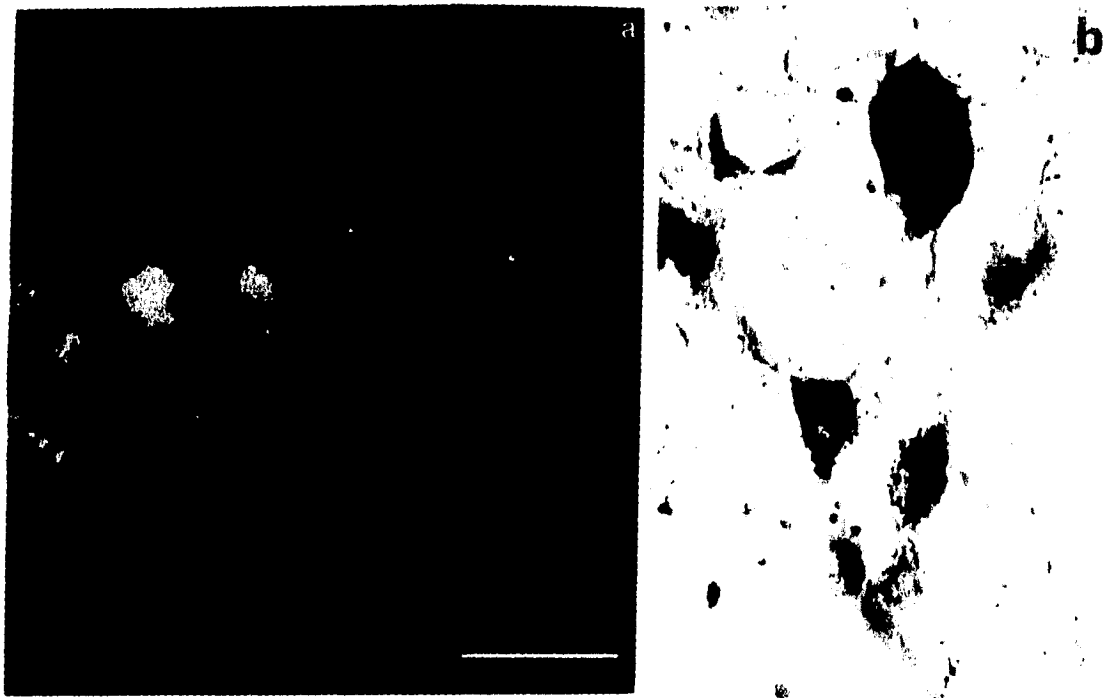


Figura 10. Fotografía del marcaje retrógrado con dos distintos marcadores. **a**: Una hilera de neuronas marcadas retrógradamente con el *fluorogold*, donde se puede apreciar el soma completamente lleno y se distingue el núcleo oscuro sin marca. **b**: Neurona marcada con HRP, donde se aprecia muy claramente las dendritas donde una de ellas se extiende mas allá de los 100 μm . Calibración: 50 μm .

Este tipo de detección de las neuronas a través de aplicar un marcador por los nervios eferentes es de alta eficiencia ya que se sabe marca prácticamente todas las

neuronas, tal es el caso que aquí presentamos, en el que se marcaron aproximadamente 25,000 neuronas (320 por corte en 80 cortes de 20 μ m) por el nervio cardíaco, el cual se sabe contiene entre 25 y 40,000 axones postganglionares (Emery, Foremen y Coggeshall, 1976; 1978).

La localización de las células marcadas retrógradamente mostró dos patrones peculiares, según se marcaban por el nervio cardíaco o por el vertebral; en el primer caso presentaron un patrón de distribución que concuerda con lo descrito (Purves, 1975; Dail y Barton, 1983), con una amplia extensión en todas las áreas, {nervio vertebral (zona C) $12.2 \pm 2.9\%$, entradas de T₃ (zona A) $24.7 \pm 3.7\%$ y T₂ (zona B) $17.8 \pm 4.5\%$ }, pero con una concentración mayor en la región cercana a la salida del nervio cardíaco (zona D) $43.6 \pm 5\%$. En cambio cuando el marcador se aplicó por el nervio vertebral, la distribución resultó claramente diferente a este tipo de patrón, ya que se distribuyeron a lo largo de una franja desde la salida del nervio vertebral hasta las entradas de T₃ y T₂. Contrario a lo correspondiente del cardíaco, en la región cercana a la salida del nervio (zona C) se encontró la menor concentración de neuronas marcadas $16.5 \pm 3.6\%$ comparado con la alta concentración encontrada en el polo opuesto del ganglio; regiones cercanas a las entradas de T₃ (zona A) $20.7 \pm 4.5\%$ y T₂ (zona B) $32.0 \pm 3.4\%$. Este tipo de distribución de ambos grupos neuronales dio lugar a que en algunas zonas como la A, B y parte de la misma C, se encontrara una población heterogénea de ambos tipos de neuronas, cardíacas y vertebrales. Otro dato inesperado fue que no obstante la primordial función cardioreguladora de este ganglio, el marcador retrógrado aplicado por el nervio vertebral llenó un número mayor, aunque

no significativo, de neuronas que por el del nervio cardíaco (553.7 ± 98.3 por corte observado) y (269.9 ± 48.4 por corte observado), respectivamente; (Prueba de T grupos independientes, $t = 2.081$; $p > 0.05$). Estos datos se muestran en las imágenes paramétricas de la figura 11 y en la gráfica y mapas de la figura 12.

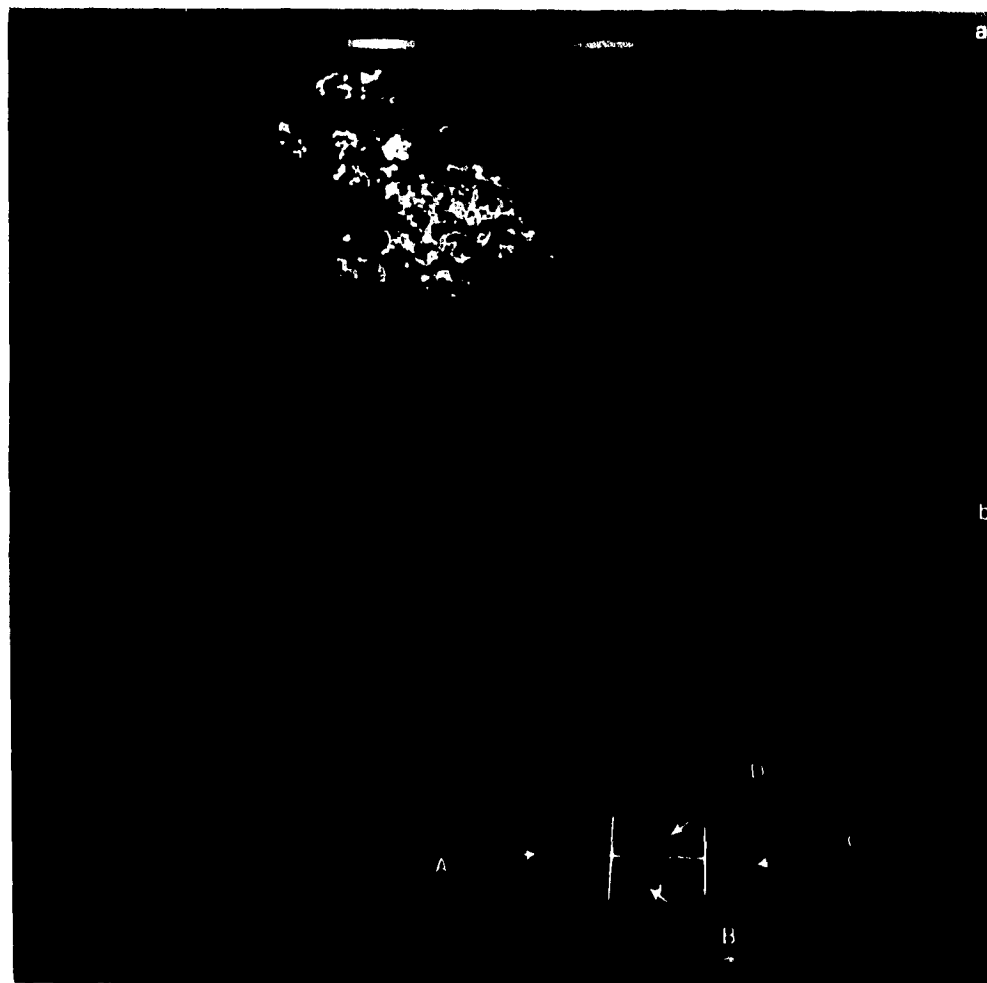


Figura 11. Imagen paramétrica de la distribución y densidad de las neuronas marcadas retrógradamente en cuatro cortes longitudinales seriados del ganglio estelar del gato. *a*: Imagen que muestra la distribución de las neuronas marcadas por el nervio cardíaco. *b*: Imagen para el caso de las neuronas marcadas por el vertebral. Los colores representan la densidad de las neuronas según la siguiente graduación: negro < violeta < azul < verde < amarillo < rojo. El área total de cada corte se dividió en cuatro regiones, de la A a la D donde cada una abarca el 25% más próximo a alguna de las aferencias y eferencias del ganglio: (zona A): el área cercana al ramo comunicante blanco torácico 3 (T_3), (zona B): la cercana al ramo comunicante blanco torácico 2 (T_2), (zona C): la cercana al nervio vertebral y (zona D), la cercana al nervio cardíaco.

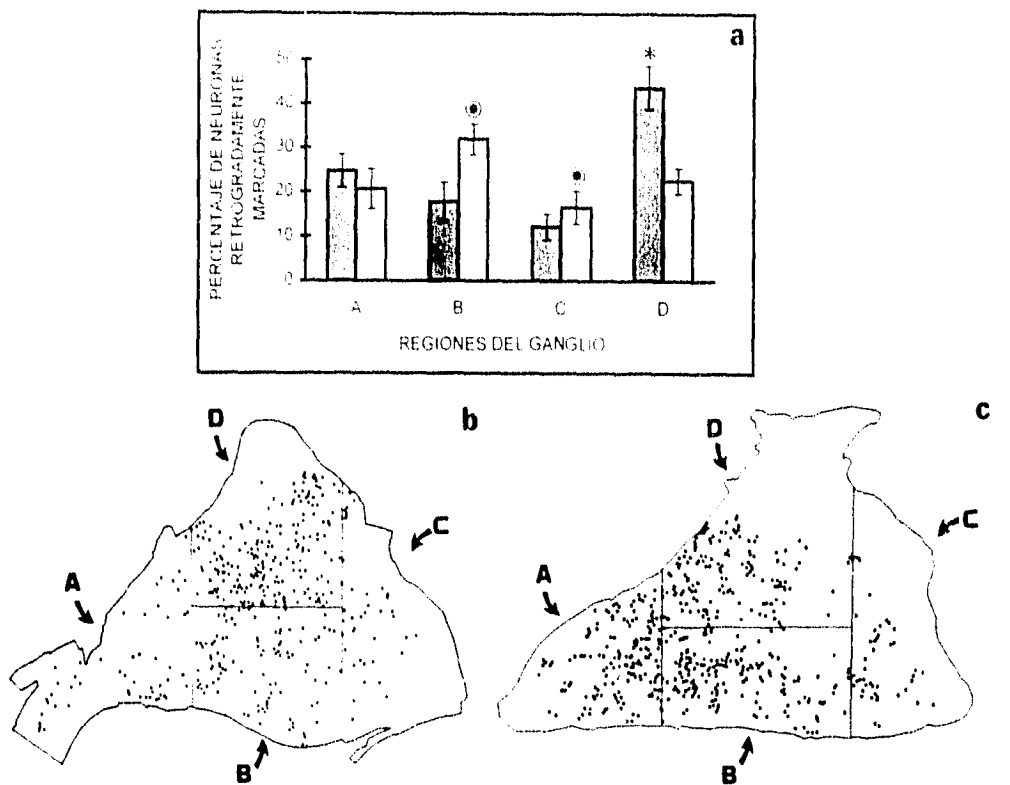


Figura 12. Resultados cuantitativos del experimento de marcaje retrógrado. **a**: Gráfica de barras del porcentaje de neuronas marcadas retrógradamente en el ganglio estelar del gato. Se muestra en las cuatro zonas del ganglio, la cantidad de neuronas marcadas por el nervio cardíaco (barras oscuras) y las neuronas marcadas por el nervio vertebral (barras vacías). La zona *D* contiene el mayor número de células cardíacas (asterisco) ($F = 8.8$; $P < 0.05$). Con respecto a las células vertebrales, la zona *B* mostró un 16% más que la zona *C* (estrellas perfiladas) (esta diferencia resultó significativa $F = 3.17$; $P < 0.05$). Como en las figuras previas (zona *A*): el área cercana al ramo comunicante blanco torácico 3 (T_3), (zona *B*): la cercana al ramo comunicante blanco torácico 2 (T_2), (zona *C*): la cercana al nervio vertebral y (zona *D*), la cercana al nervio cardíaco. **b**: Representación esquemática de un mapa de distribución de las neuronas marcadas por el cardíaco obtenida por el procesamiento de imágenes. **c**: Representación esquemática de las neuronas marcadas por el vertebral.

Neuronas ganglionares con doble eferencia

Cuando se aplicaron los dos diferentes fluorocromos (*fluorogold* y *fast blue*) simultáneamente en ambas eferencias (nervios cardíaco y vertebral), se encontró un grupo particular de neuronas en la región entre T₃ y T₂ que mostraron un doble marcaje, ya que éstos confluyeron en los somas de dichas neuronas (figura 13).

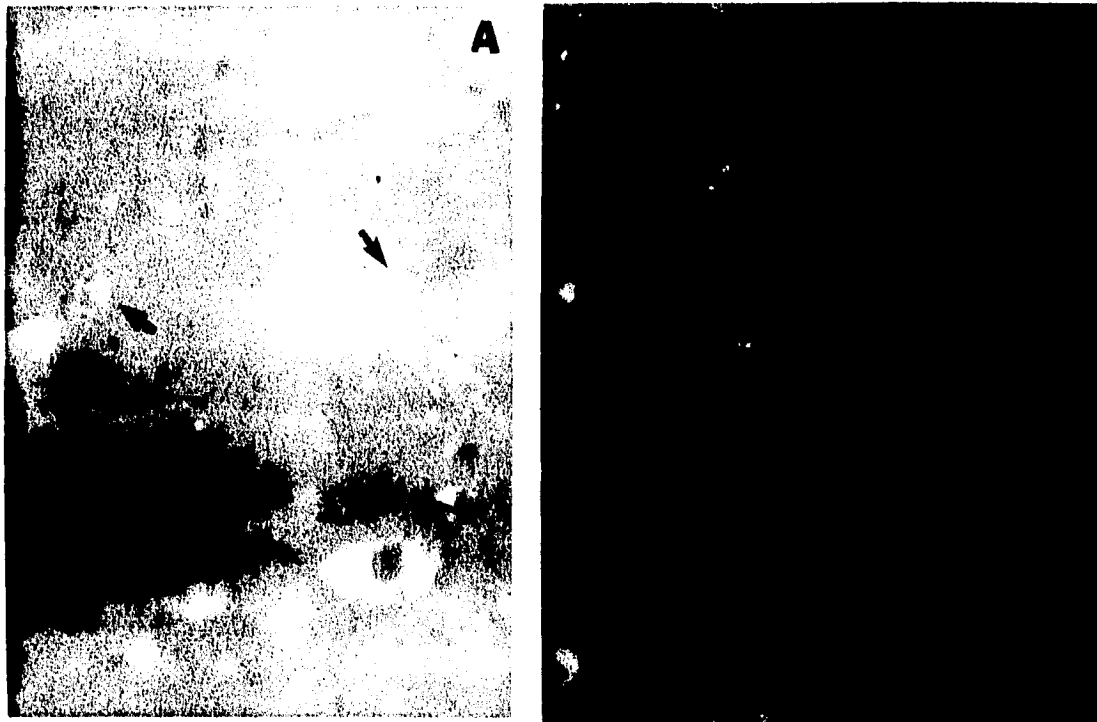


Figura 13. Fotomicrografías de secciones de 20 μm del ganglio estelar con neuronas con marcaje retrógrado simultáneo con dos diferentes fluorocromos. **A**: Región cercana a la salida del nervio vertebral (zona C) donde se distinguen neuronas marcadas con *Fluorogold* (amarillas \rightarrow) o con *Fast blue* (azules \leftrightarrow). **B**: Región cercana a la entrada de T₂ (zona B) donde se distinguen células marcadas con ambos fluorocromos (amarillas y azules \blacktriangleright)
Calibración: **A**: 50 μm y **B**: 100 μm .

Localización y distribución de receptores de NT

Como ya se mencionó en la sección de métodos, en condiciones de control, la sensibilidad del método autorradiográfico empleado no resultó suficiente para que los receptores alcanzaran niveles de detectabilidad. Sólo cuando se ligó 24 hr antes el

nervio cardíaco, se encontró marca autorradiográfica de la NT radiactiva exclusivamente sobre el soma de las neuronas ganglionares (figura 14). Las neuronas positivas se localizaron en áreas cercanas al nervio cardíaco, así como en menor cantidad cerca de la zona de las aferencias T₂ y T₃. Resultados similares se encontraron cuando el nervio ligado fue el vertebral, sólo que las neuronas eran muy escasas y distribuidas lejos del nervio en cuestión. En cambio, no hubo marca cuando se ligaron cualquiera de las aferencias (figura 15).

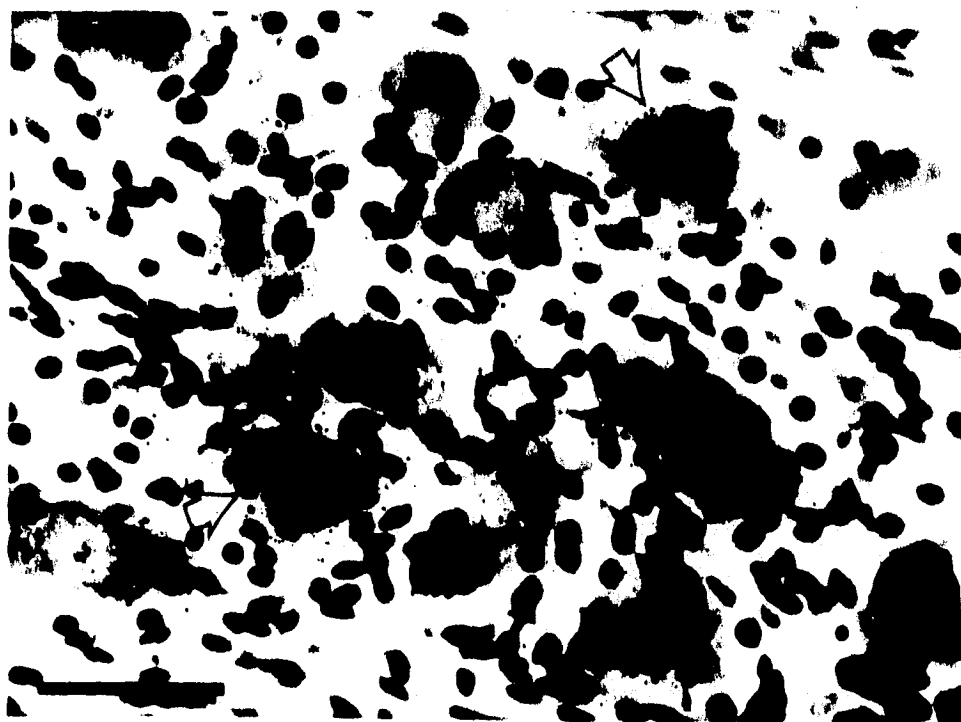


Figura 14. Fotomicrografía de autorradiogramas de neuronas ganglionares marcadas "in vitro" con ¹²⁵I-NT. El tejido corresponde a un ganglio cuyo nervio cardíaco fue ligado 24 hr antes. Nótese la acumulación de granos sobre los somas neuronales (flechas vacías). Calibración: 50 μ m.

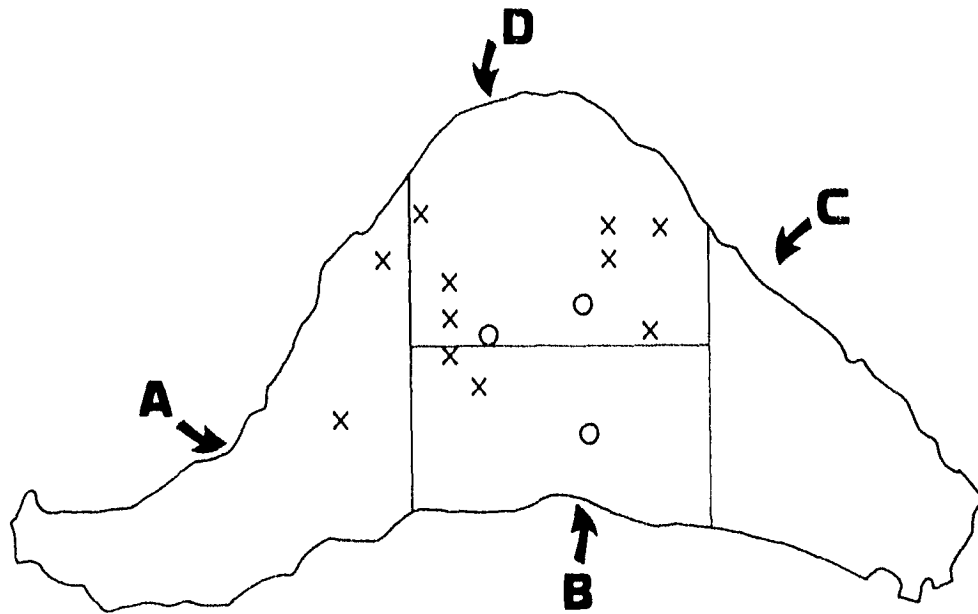


Figura 15. Representación esquemática de un mapa de la distribución de las neuronas ganglionares positivas a ^{125}I NT. Se indican las neuronas positivas después de ligar el nervio cardíaco (cruces) o el nervio vertebral (círculos), así como las cuatro zonas en las que se dividió el ganglio: (zona A): el área cercana al ramo comunicante blanco torácico 3 (T_3), (zona B): la cercana al ramo comunicante blanco torácico 2 (T_2), (zona C): la cercana al nervio vertebral y (zona D), la cercana al nervio cardíaco.

DISCUSIÓN

Los resultados del presente trabajo, confirman la presencia de NT en las terminaciones axónicas del ganglio estelar del gato (Lundberg, et al. 1982 y Morales et al. 1993). Se encontró además, una amplia y heterogénea distribución de estas terminaciones en todas las regiones exploradas del ganglio, tanto en las áreas ocupadas por neuronas cardíacas como por no cardíacas. Según estos datos, la presencia aunque en menor cantidad de terminaciones IRNT cercanas a las neuronas cardíacas puede ser considerada como sustento morfológico de la función cardioreguladora reportada de la NT (Bachoo y Polosa, 1988). Sin embargo, la asociación de estas terminaciones con neuronas no cardíacas sugiere además, la participación de este péptido en la regulación de otras funciones autonómicas no cardíacas. Una distribución regional similar de terminaciones IRNT se ha reportado en el ganglio paravertebral del gato (Lundberg, et al. 1982; Heym, et al. 1984). Por otro lado, en el ganglio torácico de gato, Kummer y Heym (1988) describieron una localización diferente de las terminaciones con NT, con una localización preferencial en la parte central del ganglio, mientras las partes caudal y cranial casi no poseen estas terminales. De manera semejante, no se encontraron terminales con NT en un estudio hecho en el ganglio estelar del perro (Darvesh, Nance, Hopkins y Armour, 1987). Mientras que en el ganglio celíaco de gato, las terminaciones con NT mostraron una distribución mas homogénea (Lundberg, et al. 1982). Estas distribuciones heterogéneas en el ganglio simpático, también han sido descritas para otros péptidos además de la NT (Kummer y Heym, 1988; Keast, 1991; Gibbins, 1992; Morales, et al. 1995).

Los experimentos de marcaje retrógrado, en parte confirman que en efecto las neuronas ganglionares se agrupan en conjuntos o núcleos según el nervio eferente por donde envían sus axones, como lo propusieron Purves (1975) y Dail y Barton (1983), esto fue válido sólo cuando las neuronas se marcaron a través del nervio cardíaco. Sin embargo, a diferencia de lo antes mencionado, estos núcleos no solamente se pueden encontrar en las cercanías de los nervios sino que también se presentan en sitios distantes como en el caso de las neuronas que envían sus axones por el nervio vertebral. La razón por la que las neuronas con eferencias en el nervio vertebral se agrupan precisamente en el polo opuesto de la salida del nervio y que sus axones prácticamente atraviesan el ganglio antes de abandonarlo, queda por ser elucidada. Un patrón similar de distribución de células ganglionares cardíacas se ha descrito en el ganglio estelar de rata (Mo et al. 1994). Por otro lado estos autores no encontraron diferencias en las características morfológicas y electrofisiológicas entre las poblaciones de neuronas cardíacas y no cardíacas, contrario a los reportes de McLachlan y Meckler (1989) en el ganglio celíaco de cobayo, y de Luebke y Wright (1992) en el ganglio cervical superior de rata. También por medio de estudios de marcaje retrógrado, en el ganglio estelar de perro, Darvesh y colaboradores (Darvesh, et al. 1987) definieron, una subpoblación de neuronas postganglionares cardiopulmonares, localizadas en cúmulos específicos cerca de la salida del polo caudal o nervio cardiopulmonar, donde se aplicó el marcador. En el cobayo, la parte ventro medial del ganglio estelar, contiene neuronas que se marcaron retrógradamente cuando el marcador fue introducido a través de los pulmones y tráquea (Kummer,

Fisher, Kurkowsky y Heym, 1992), principalmente en esta región nosotros encontramos a la mayoría de las células con axones en el nervio cardíaco, lo cual indica que estas células llamadas cardíacas, inervan otras estructuras torácicas además del corazón.

Por otra parte, aunque no significativa, se encontró una tendencia de mayor cantidad de neuronas ganglionares marcadas por el nervio vertebral, que por el nervio cardíaco, lo que apunta a que este ganglio, además de su función cardioreguladora, también podría participar de manera relevante en otras funciones autonómicas, asociadas a la inervación del nervio vertebral.

El resultado de las neuronas marcadas con los dos fluorocromos simultáneamente, pudiera explicarse ya sea por un paso del marcador a través de conexiones interneuronales o que algunas neuronas ganglionares puedan tener axones ramificados que salgan por dos eferencias diferentes, ambas posibilidades alentan a realizar estudios futuros. La posibilidad del paso del marcador de una neurona a otra sin embargo es poco probable, según un cuidadoso trabajo morfológico de marcaje intracelular en el ganglio cervical superior de la rata, Kiraly y colaboradores (Kiraly, Favrod y Matthews, 1989) donde no encontraron ningún indicio de comunicación interneuronal que permita el paso del marcador de una neurona a otra, no obstante el abundante número de contactos dendrodendríticos y dendrosomáticos encontrados.

En relación a los receptores de NT, y según habíamos reportado en una comunicación preliminar (Morales, Carbó, Bachoo, Polosa y Beaudet, 1994), se encontró una baja concentración de los mismos, de tal suerte que en las condiciones

de control no fue posible detectarlos, esto hablaría de que en efecto existen pocos receptores o que la técnica autorradiográfica no alcanza a detectarlos. Sólo al ligar los axones de las neuronas ganglionares fue posible hacerlo. La explicación de este aumento en los receptores de NT, como consecuencia de la ligadura, puede explicarse al menos de dos formas: que la ligadura detenga el flujo centrífugo de los receptores a través de la membrana plasmática, {se sabe que las proteínas de la membrana celular se pueden desplazar sobre el plano de la misma, (Alberts, Bray, Lewis, Raff, Roberts y Watson, 1994)} lo que conduciría a un aumento en el soma; o que como reacción al daño se sintetizan y sitúan en la membrana celular más receptores. Este tipo de aumento en receptores peptidérgicos como respuesta a la lesión axonal ya se ha descrito (Aanonsen, Kajander, Benett y Seybold, 1992). Queda entonces por explicar como con pocos receptores, la NT puede tener un efecto modulador sobre la actividad ganglionar; la respuesta pudiera ser si estos receptores correspondieran a los de alta afinidad descritos por Tanaka (Tanaka, et al. 1990).

En relación a la función de regulación cardíaca de la neurotensina por su aplicación exógena (Bachoo y Polosa, 1988), encontramos que de hecho las células que se proyectan a este órgano están intercaladas con una buena cantidad de terminales que contienen NT, tanto en el área cercana a la salida del nervio cardíaco (zona *D*), como también en el área donde precisamente se encontró el cúmulo de mayor número de estas terminaciones (zonas *A-B*), lo que pudiera resultar suficiente para poder sustentar morfológicamente la cardioregulación del péptido. En este contexto, es relevante considerar además, la quimiosensibilidad variable de las células

ganglionares hacia los péptidos (Aiken y Reit, 1968; Williams, Katayama y North, 1979; Mo et al. 1994), así como la localización preferencial de los receptores de NT en estas subpoblaciones de células ganglionares y finalmente el extenso árbol dendrítico descrito de las células ganglionares (Gibbins, Rodgers y Matthew, 1995), lo que en general favorecería la acción moduladora de cardioregulación de la NT. Resulta relevante también considerar la posibilidad de que la NT liberada de terminaciones distantes a las células cardíacas pudieran ejercer su efecto debido al mecanismo conocido como transmisión de volumen (Fuxe y Agnati, 1991).

El hecho de que existan terminaciones IRNT en zonas donde hay una población mayoritaria de neuronas vertebrales sugiere que la NT puede además participar en alguna función autonómica de las reguladas por estas neuronas, como sería el control vascular de las extremidades superiores. Esta función propuesta para la NT abre la posibilidad de explorarla a futuro con experimentos donde se aplique exógenamente la NT y se registren por ejemplo, los posibles cambios de tensión arterial de las extremidades superiores.

En relación al cúmulo descrito de mayor concentración de terminaciones IRNT, llama la atención que se hayan detectado en una zona donde se encontraron ambas poblaciones de neuronas cardíacas, y en mayor proporción vertebrales, lo que también apoya nuestra propuesta de que la NT no sólo participa en la cardioregulación, sino que también puede modular las funciones autonómicas reguladas por la subpoblación de neuronas vertebrales.

Como se ha mencionado a lo largo de esta tesis, la localización y distribución de diversos péptidos, incluida la NT, ha sido extensamente documentada en varios ganglios simpáticos. En este contexto la contribución relevante de este trabajo fue, además de describir la distribución topográfica de las terminaciones IRNT y de las subpoblaciones de neuronas ganglionares, el tratar de establecer una correlación morfofuncional entre estas distribuciones, lo que en general sustentaría las bases morfológicas de funciones neuromodulatorias peptidérgicas.

CONCLUSIONES

1. No obstante, el patrón heterogéneo de distribución, las terminaciones IRNT se extendieron en prácticamente todas las áreas del ganglio estelar.
2. Se encontraron dos subpoblaciones de neuronas ganglionares principales, según la eferencia por donde envían sus axones. Las que siguen la eferencia cardíaca (cardíacas) se localizan preferencialmente cercanas a la salida del nervio, mientras las que envían sus axones por el nervio vertebral (vertebrales), ocupan una franja homogénea que se extiende mas allá de la salida del nervio, con mayor concentración en el polo opuesto a la salida del nervio.
3. Existen pocos receptores de NT, de tal manera que sólo la ligadura axónica los revela. Las neuronas que los expresan fueron preferentemente las cardíacas cercanas a la salida del nervio.
4. La presencia de terminaciones IRNT, aunque en menor cantidad, asociadas a las neuronas cardioreguladoras apoyan el sustento morfológico de la modulación de la función cardíaca por NT.
5. Dado que también se encontró terminaciones IRNT muy cercanas a las neuronas no cardíacas, se debe considerar que la NT además de su modulación sobre la función cardíaca, pudiera participar en otras funciones reguladas por este ganglio simpático.

REFERENCIAS

- Aanonsen L.M., Kajander K.C., Bennett G.J. and Seybold V.S. (1992). Autoradiographic analysis of ¹²⁵I-substance P binding in rat spinal cord following chronic constriction injury of the sciatic nerve. *Brain Res.*, **596**: 259-268.
- Aiken J.W. and Reit E. (1968). Differential excitation of adrenergic and cholinergic sympathetic ganglion cells. *Pharmacologist.*, **10**: 355.
- Alberts B., Bray D., Lewis J., Raff M., Roberts K. and Watson J.D. (1994). The nervous system. In: *Molecular biology of the cell*. 3^o Edition. Garland Publishing Inc. New York and London. pp:1059-1136.
- Bachoo M., Ciriello J. and Polosa C. (1987). Effect of preganglionic stimulation of neuropeptide-like immunoreactivity in the stellate ganglion of the cat. *Brain Res.*, **400**: 377-382.
- Bachoo M. and Polosa C. (1988). Cardioacceleration produced by close intra-arterial injection of neurotensin into the stellate ganglion of the cat. *Can. J. Physiol. Pharmacol.*, **66**: 408-412.
- Bean A.J., Zhang X. and Hökfelt T. (1994) Peptide secretion: What do we know?. *FASEB J.*, **8**:630-638.
- Beaudet A., Mazella J., Nouel D., Chabry J., Castel M., Laduron P., Kitabgi P. and Faure M.P. (1994). Internalization and intracellular mobilization of neurotensin in neuronal cells. *Biochem. Pharmacol.*, **47**: 43-52.
- Burbach J.P.H. and Meijer O.C. (1992). The structure of neuropeptide receptors. *Europ. J. Pharmacol. (Molecular Pharmacology Section)*, **227**: 1-18.
- Cajal S.R. (1911). *Histologie du Système Nerveux de l' Homme et des Vertébrés*. Inst. Ramón y Cajal. Madrid.
- Carraway R. and Leeman S.E. (1973). The isolation of a new hypotensive peptide, neurotensin, from bovine hypothalamus. *J. Biol. Chem.*, **248**: 6854-6861.
- Carraway R. and Leeman S.E. (1975). The amino acid sequence of a hypothalamic peptide neurotensin. *J. Biol. Chem.*, **250**: 1907-1911.
- Corkidi G. (1989). *Système d'analyse de préparations histologiques par imagerie numérique Histo 200: Application à l' étude physiopathologique de la maladie de Parkinson*. Thèse de Doctorat, Université, Paris val de Marne.

- Dail W.G. and Barton S. (1983). Structure and organization of mammalian sympathetic ganglia. In: Lars-Gösta Elfvín (Ed). *Autonomic Ganglia*. John Wiley and Sons Ltd. pp:3-25.
- Darvesh S., Nance D.M., Hopkins D.A. and Armour J.A. (1987). Distribution of neuropeptide-like immunoreactivity in intact and chronically decentralized middle cervical and stellate ganglia of dogs. *J. Auton. Nerv. Syst.*, **21**: 167-180.
- De Castro F. (1951). Aspects anatomiques de la transmission synaptique ganglionnaire chez les mamifères. *Arch. Int. Physiol. Biochem.*, **59**: 479-511.
- Elfvín L-G., Lindh B. and Hökfelt T. (1993). The chemical neuroanatomy of sympathetic ganglia. *Ann. Rev. Neurosci.*, **16**: 471-507.
- Emery D.G., Foreman R.D. and Coggeshall R.E. (1976). Fiber analysis of the feline inferior cardiac sympathetic nerve. *J. Comp. Neurol.*, **166**: 457-467.
- Emery D.G., Foreman R.D. and Coggeshall R.E. (1978). Categories of axons in the inferior cardiac nerve of the cat. *J. Comp. Neurol.*, **177**: 301-310.
- Fuxe K. and Agnati L.F. (1991). Two principal modes of electrochemical communication in the brain: volume versus wiring transmission. In: K. Fuxe and L.F. Agnati (Eds) *Volume transmission in the brain, novel mechanisms for neural transmission*. Raven, New York, N. Y. pp:1-9.
- Gibbins I.L. (1992). Vasoconstrictor, vasodilator and pilomotor pathways in sympathetic ganglia of guinea-pigs. *Neuroscience*, **47**: 657-672.
- Gibbins I.L., Rodgers H. and Matthew S. (1995). Serial section ultrastructural analysis of synaptic inputs to dendrites and cell bodies of dye-filled neurons in guinea-pig sympathetic ganglia. *Soc. Neurosci., Abs.* **21**:1401.
- Gotow T. (1992). The cytoplasmic structure of the axon terminal. *Prog. Neurobiol.*, **39**: 443-474.
- Hamel E. and Beaudet A. (1987). Opioid receptors in rat neostriatum: radioautographic distribution at the electron microscopic level. *Brain Res.*, **401**: 239-257.
- Heym CH., Reinecke M., Weihe E. and Torssmann W.G. (1984). Dopamine- β -hydroxylase, neurotensin, substance P, vasoactive intestinal peptide (VIP) and enkephalin-immunohistochemistry of paravertebral and prevertebral ganglion in cat. *Cell Tissue Res.*, **235**: 249-270.
- Hirsch E.C., Lejeune O., Colliot G., Corkidi G. and Tajani M. (1992). Computer methods in nuclei cartography. *Methods in Neuroscience*, **10**:62-79.

- Hökfelt T. (1991). Neuropeptides in perspective: The last ten years. *Neuron*, 7: 867-879.
- Jessell T.M. and Kandel E.R. (1993). Synaptic transmission: A bidirectional and self-modifiable form of cell-cell communication. *Cell* 72/ *Neuron*, 10 (suppl.): 1-30.
- Kandel E.R., Seigelbaum S.A. and Schwartz J.H. (1991). Synaptic transmission. In: Kandel E.R., Schwartz J.H. and Jessell T.M. (Eds). *Principles of Neural Science*. Elsevier Science Publishing, Co. pp: 123-134.
- Keast J.R. (1991). Patterns of coexistence of peptides and differences of nerve fiber types associated with noradrenergic and non-adrenergic (putative cholinergic) neurons in the major pelvic ganglion of the male rat. *Cell Tissue Res.*, 266:405-415.
- Kenigsberg R.L., Semenenko F.M. and Cuello A.C. (1990). Development of bi-specific monoclonal antibody for simultaneous detection of rabbit IgG and horseradish peroxidase: Use as general reagent in immunohistochemistry and enzyme-linked immunoabsorbent assay. *J. Histochem. Cytochem.*, 38:191-198.
- Kiraly M., Favrod P. and Matthews M.R. (1989). Neuroneuronal interconnections in the rat superior cervical ganglion: possible anatomical bases for modulatory interactions revealed by intracellular horseradish peroxidase labelling. *Neuroscience*, 33: 617-642.
- Kumer W. and Heym C. (1988). Neuropeptide distribution in the cervico-thoracic paravertebral ganglia of the cat with particular reference to calcitonin gene-related peptide immunoreactivity. *Cell Tissue Res.*, 252: 463-471.
- Kumer W., Fisher A., Kurkowsky R. and Heym C. (1992). The sensory and sympathetic innervation of guinea-pig lung and trachea as studied by retrograde neuronal tracing and double-labeling immunohistochemistry. *Neuroscience*, 49: 715-737.
- Kupfermann I. (1991). Functional studies of cotransmission. *Physiological Reviews.*, 71:683-732.
- Krukoff T.L., Ciriello J. and Calaresu F.R. (1985). Segmental distribution of peptide-like immunoreactivity in cell bodies of the thoracolumbar sympathetic nuclei of the cat. *J. Comp. Neurol.*, 240: 90-102
- Leeman S.E. and Carraway R.E. (1982). Neurotensin: discovery, isolation, characterization, synthesis and possible physiological roles. In: Nemeroff and Prange A. (Eds). *Neurotensin, A brain and gastrointestinal peptide*. Ann. New York Acad. Sci. 400:1-16.

- Luebke J.I. and Wright L.L. (1992). Characterization of superior cervical ganglion neurons that project to the submandibular glands, the eyes and the pineal gland in rats. *Brain Res.*, **589**: 1-14.
- Lundberg J.M., Rökaeus A., Hökfelt T., Rosell S., Brow M. and Goldstein M. (1982). Neurotensin-like immunoreactivity in the preganglionic sympathetic nerves and in the adrenal medulla of the cat. *Acta Physiol. Scand.*, **114**: 153-155.
- Maher E., Bachoo M., Cernacek P. and Polosa C. (1991). Dynamics of neurotensin stores in the stellate ganglion of the cat. *Brain Res.*, **562**: 258-264.
- McKibben J.S. and Getty R. (1968). A comparative morphologic study of the cardiac innervation in domestic animals. II. The feline. *Am. J. Anat.*, **122**:545-554.
- McLachlan E.M. and Meckler R.L. (1989). Characteristics of synaptic input to three classes of sympathetic neurons in the coeliac ganglion of the guinea pig. *J. Physiol.*, **415**: 109-129.
- Mo N., Wallis D.I. and Watson A. (1994). Properties of putative cardiac and non-cardiac neurons in the rat stellate ganglion. *J. Auton. Nerv. Syst.*, **47**: 7-22.
- Morales M.A., Bachoo M., Beaudet A., Collier B. and Polosa C. (1993). Ultrastructural localization of neurotensin immunore activity in the stellate ganglion of the cat. *J. Neurocytol.*, **22**:1017-1021.
- Morales M.A., Carbó R., Bachoo M., Polosa C. and Beaudet A. (1994). Cellular localization of neurotensin receptors in the cat stellate ganglion. *Soc. Neurosci., Abs.* **20**:84.
- Morales M.A., Holmberg K., Xu Z., Cozzari C., Hartman B.K., Emson P., Goldstein M., Elfvin L. and Hökfelt T. (1995). Localization of choline acetyltransferase in rat peripheral sympathetic neurons and its coexistence with nitric oxide synthase and neuropeptides. *Proc. Natl. Acad. USA.*, **92**:11819-11823.
- Pardini B.J. and Wurster R.D. (1984). Identification of the sympathetic preganglionic pathway to the cat stellate ganglion. *J. Auton. Nerv. Syst.*, **22**: 13-25.
- Phillips J.G., Randall W.C. and Armour J.A. (1986). Functional anatomy of the major cardiac nerves in cats. *Anatomical Rec.*, **214**: 365-371.
- Purves D. (1975). Functional and structural changes in mammalian sympathetic neurons following interruption of their axons. *J. Physiol.*, **252**:429-463
- Redgate E.S. (1993). Peripheral autonomic nervous system. In: Sperelakis, N. and Banks R.O. (Eds). *Physiology*. Little, Brown and Company. Boston, Toronto and London. pp:151-165.

- Rioux F., K rouac R. and Quirion R. (1982). Mechanisms of the cardiovascular effects of neurotensin. In: Nemeroff and Prange A. (Eds). Neurotensin, A brain and gastrointestinal peptide. Ann. N. Y. Acad. Sci. 400:56-74.
- Sikl s L., P rducz A., Hal sz N., Rickmann M., Jo  F. and Wolff J.R. (1990). An unbiased estimation of the total number of synapses in the superior cervical ganglion of adult rats established by the disector method. Lack of change after long-lasting sodium bromide administration. J. Neurocytol., 19: 443-454.
- Snyder S.H. (1980). Brain peptides as neurotransmitters. Science, 209: 976-983.
- Tanaka K., Masu M. and Nakanishi S. (1990). Structure and function expression of the cloned rat neurotensin receptor. Neuron, 4: 847-854.
- Thureson-Klein A.K. and Klein R.L. (1990). Exocytosis from neuronal large dense-cored vesicles. Inter. Review of Cytol., 121:67-120.
- Watson M., Isackson P.J., Makker M., Yamada M.S., Yamada M., Cusak B. and Richelson E. (1993) Identification of a polymorphism in the human neurotensin receptor gene. Mayo Clin. Proc., 68:1043-1048.
- Weldon P., Bachoo M., Morales M.A., Collier B. and Polosa C. (1993). Dynamics of large dense cored vesicles in synaptic boutons of the cat superior cervical ganglion. Neuroscience, 55:1045-1054.
- Williams J.T., Katayama Y. and North R.A. (1979). The action of neurotensin on single myenteric neurons. Europ. J. Farmacol., 59:181-186.
- Zhang X., Nicholas P. and Hökfelt T. (1993). Ultrastructural studies on peptides in the dorsal horn of the spinal cord-I. Co-existence of galanin with other peptides in primary afferents in normal rats. Neuroscience, 57:365-384.