

Tesis de Posgrado

Estudio neurofarmacológico acerca de la función del ácido gamma-aminobutírico en el ganglio simpático cervical superior

González Burgos, Guillermo Ricardo

1995

Tesis presentada para obtener el grado de Doctor en Ciencias Biológicas de la Universidad de Buenos Aires

Este documento forma parte de la colección de tesis doctorales y de maestría de la Biblioteca Central Dr. Luis Federico Leloir, disponible en digital.bl.fcen.uba.ar. Su utilización debe ser acompañada por la cita bibliográfica con reconocimiento de la fuente.

This document is part of the doctoral theses collection of the Central Library Dr. Luis Federico Leloir, available in digital.bl.fcen.uba.ar. It should be used accompanied by the corresponding citation acknowledging the source.

Cita tipo APA:

González Burgos, Guillermo Ricardo. (1995). Estudio neurofarmacológico acerca de la función del ácido gamma-aminobutírico en el ganglio simpático cervical superior. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.

http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_2736_GonzalezBurgos.pdf

Cita tipo Chicago:

González Burgos, Guillermo Ricardo. "Estudio neurofarmacológico acerca de la función del ácido gamma-aminobutírico en el ganglio simpático cervical superior". Tesis de Doctor. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 1995.

http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_2736_GonzalezBurgos.pdf

EXACTAS UBA

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



UBA

Universidad de Buenos Aires

Universidad de Buenos Aires

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

Estudio neurofarmacológico acerca de la
función del ácido γ -aminobutírico en el
ganglio simpático cervical superior

Trabajo presentado para optar al título de Doctor de la Universidad de
Buenos Aires



Autor: Guillermo R. González Burgos

Director: Daniel P. Cardinali

Lugar de Trabajo: Departamento de Fisiología, Facultad de Medicina,
UBA.

1995

Con frecuencia he dicho que de la ameba a Einstein hay un solo paso. Ambos trabajan con el método de ensayo y error. La ameba debe de odiar el error, pues muere cuando lo comete. Pero Einstein sabe que sólo podemos aprender de nuestros errores, y no ahorra esfuerzo alguno en hacer nuevos ensayos para detectar nuevos errores y para eliminarlos de nuestras teorías. El paso que la ameba no puede dar, pero Einstein sí, es lograr una actitud crítica, autocrítica, un enfoque crítico.

Karl R. Popper
Hacia una teoría evolutiva del conocimiento,
1989

Agradecimientos

Al Dr. Daniel Cardinali, por permitirme desarrollar este trabajo de Tesis con libertad y bajo la guía permanente de su espíritu crítico y su inagotable capacidad de trabajo.

A Fabián Biali, amigo y co-equipero de arduas horas de setup, por introducirme al mundillo electrofisiológico.

A Ruth, por la driving force inicial y por nuestras discusiones permanentes de las que aprendí "casi" todo.

A Diego y Ruth porque creyeron en mí (pese a mí) y posibilitaron el comienzo de esta historia.

A mis Actuales (Adriana, Bea, Fabián, Graciela, Lidia, Lucas, María Ines, Marcelo, Paola, Paula, Rodolfo, Rosalía, Ruth, Salvator, Valeria) y Antiguos (Diego, El Kalpa, Esteban, Gabriela, Guillermo, Javier, Jorgito, La Pochi, Leonardo, Maritxu, Sandra, SuMin) compañeros de Lab, por aguantar mi mal humor intermitente (o constante?).

A mis viejos, a Chechi, Gaby, Vicky y Auri. A Irma y Luchi y a la familia Kanterewicz. A mi abuelo Juan Burgos.

A mis amigos Dani, Mariana, Pocho, Flaco, Juancho.

A los chicos de la secta de ex-Santa Clara: Adali, Andresito, Ernesto, Felipe, Juan Carlos, Pedro, Sandra, Claudia (sectaria externa).

A mis compañeros de estudios, que me ayudaron a mantener el cable a tierra durante los años facultativos: Dani Calvo, Mariana Del Vas, Juancho Bouzat, Fabiana Kubke, Walter Farina, Fernando Marengo, Roxana Josens, Dario Protti, Dani Carpi, Diego Golombek, Beto Civetta, El Polaco, Fabi Skornik, Rudy Bernabeu, Pablo Schwartzbaum, Gabriel Manrique, Pablo Rabinowicz, Marcelo Lorenzo, Susana Levy.

A la gente del Lab. de Esteroides que me guió en mis primeros pasos: Adali Pecci, Nora Ceballos, Carlos Lantos.

A los amigos del Lab. de Electrofisiología del IBC: Daro, Marce, Ferro, Carlitos, Verónica, Eleonora, Silvina, Viviana, Osvaldo (el jefe).

A los muchachos de Virulazo y del imprescindible fútbol de los jueves-viernes: Gabo, Rudy, Pablo, Gabelli, Daro, Dani, Pocho, Flaco, Sergio Angel, Gus, Negro Lorenzo, Santiago, Marcelo Rubinstein. A River Plate Campeón Metropolitano 1975.

Al Dr. Cleto Santa Coloma.

A la Universidad de Buenos Aires, por haberme otorgado becas y cargos que me permitieron subsistir en la actividad científica y universitaria

Al Departamento de Fisiología de la Facultad de Medicina donde se realizó este trabajo.

A los compañeros de docencia en Neuro por la buena onda.

A Bea y Joaquín

INDICE

ABREVIATURAS.....	5
-------------------	---

INTRODUCCION.....	7
-------------------	---

Funciones de la división simpática del sistema nervioso autónomo. – Papel de los ganglios periféricos en la fisiología del sistema simpático. – El ganglio cervical superior: consideraciones anatómicas y funcionales. – La transmisión sináptica ganglionar es mediada por acetilcolina. – Modulación de la transmisión en el ganglio cervical superior: mecanismos actividad-dependientes. – Modulación de la transmisión en el ganglio cervical superior: neuromoduladores no colinérgicos. – Rol del GABA en el ganglio cervical superior: evidencias previas. – Objetivos.

MATERIALES Y METODOS.....	31
---------------------------	----

Animales y tejidos de experimentación. – Procedimientos quirúrgicos: desnervación preganglionar – Captación de $^3\text{H-GABA}$ – Eflujo de $^3\text{H-GABA}$ – Influjo de $^{36}\text{Cl}^-$ Eflujo de $^3\text{H-Acetilcolina}$ – Descarboxilación de $1\text{-}^{14}\text{C-Glutamato}$ – Registro electrofisiológico extracelular – Protocolo de inducción de potenciación postetélica – Análisis de los datos – Soluciones – Drogas y reactivos

RESULTADOS.....	43
-----------------	----

Parte 1: Transporte y liberación de $^3\text{H-GABA}$	43
---	----

1.1. Transporte de GABA.....	43
------------------------------	----

Caracterización cinética, Farmacología, Efecto de la desnervación preganglionar.

1.2. Liberación de GABA.....	50.
------------------------------	-----

Efecto de la elevación de la $[\text{K}^+]$, Dependencia con el Ca^{2+} externo, Efecto de inhibidores de los transportadores, Efecto de la desnervación preganglionar y preincubación en presencia de inhibidores del transporte, Acción de la veratrina, agonistas de receptores de neurotransmisores y estimulación eléctrica preganglionar.

Parte 2: Efectos del GABA sobre la transmisión ganglionar.....	67
--	----

2.1. Efecto del GABA sobre la transmisión ganglionar.....	67
---	----

Efecto del GABA sobre el influjo de $^{36}\text{Cl}^-$ en células dispersas, Efecto del GABA sobre la transmisión, Farmacología, Efecto del GABA sobre la transmisión dirigida el nervio carotídeo externo.

2.2. Efecto del GABA sobre la potenciación de largo plazo	84
---	----

Efecto de la aplicación de GABA exógeno, Farmacología, Facilitación por picrotoxina de la inducción de potenciación.

Parte 3: Papel del GABA en la fisiología del GCS. Estudio de su participación en la expresión de ritmicidad circadiana.....	99.
3.1. Variaciones horarias en la síntesis de GABA y efecto sobre la liberación de ACh.....	99
3.2. Variaciones horarias en parámetros colinérgicos.....	103
DISCUSION	107
REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS.....	121

ABREVIATURAS

acetil-CoA	acetil coenzima A
ACh	acetilcolina
AChE	acetil colinesterasa
AMPc	monofosfato de adenosina cíclico
ATP	trifosfato de adenosina
CAT	colina acetil transferasa
CCVD	canal de calcio voltaje dependiente
CE ₅₀	concentración que produce 50 % del efecto máximo
Ch	colina
CI ₅₀	concentración que produce 50 % del inhibitorio efecto máximo
DA	dopamina
DABA	ácido 2,4 - diaminobutírico, 2,4 - diaminobutirato
ECl	potencial de equilibrio del cloro
EGTA	ácido etilenglicobis (amino etil éter) tetraacético
GABA	ácido γ -aminobutírico
GABA-T	GABA transaminasa
GAD	glutamato descarboxilasa
GCS	ganglio cervical superior
GMPc	monofosfato de guanosina cíclico
HEPES	ácido hidroxietilpiperazin-etanosulfónico
LTP	potenciación de largo plazo ("Long-Term Potentiation")
mR	receptor muscarínico
NA	noradrenalina
NCE	nervio carotídeo externo
NCI	nervio carotídeo interno
nR	receptor nicotínico
PAC	Potencial de Acción Compuesto
PPSE	potencial postsináptico excitatorio
PPSI	potencial postsináptico inhibitorio
PTP	potenciación postetánica de corto plazo
2OH saclofen	2 hidroxietilpiperazin-etanosulfónico
SIF	small intensely fluorescent
SNA	sistema nervioso autónomo
SNC	sistema nervioso central
TCA	ácido tricloro acético
TSC	tronco simpático cervical
TTX	tetrodotoxina
V _m	potencial de membrana

INTRODUCCION

Funciones de la división simpática del sistema nervioso autónomo.

En los organismos pluricelulares, las células forman poblaciones diferenciadas que se agrupan en sistemas, como los tejidos y órganos, para cumplir funciones específicas. Estas distintas funciones se coordinan, en los animales, a través de la actividad de los dos sistemas principales de comunicación intercelular: el sistema nervioso y el sistema endocrino (Cardinali, 1988).

La comunicación entre células se realiza frecuentemente por medio de mensajeros químicos. En el sistema nervioso, el mensajero (neurotransmisor) se libera desde las neuronas en respuesta a una señal bioeléctrica (potencial de acción), en los sitios especiales (sinapsis) donde ocurre el evento de comunicación. El reconocimiento específico del mensajero se transduce en señales eléctricas y/o bioquímicas en la célula receptora.

Las prolongaciones celulares (axones) de las neuronas forman rutas anatómicas que conectan sistemas o territorios específicos del organismo y conducen las señales eléctricas a gran velocidad, proveyendo así de un mecanismo de comunicación rápida y "privada", ya que el neurotransmisor actúa en forma breve y localizada sobre las células blanco de la vía anatómica en cuestión (Cardinali, 1988).

Una de las consecuencias más importantes de la coordinación e integración de las actividades de los tejidos y órganos es la homeostasis, o mantenimiento de las variables fisiológicas dentro del rango de valores adecuado para el funcionamiento normal del organismo (Cardinali, 1995). En los vertebrados, para la realización de esta función es necesaria la actividad del Sistema Nervioso Autónomo (SNA), división del sistema nervioso cuyas neuronas inervan a casi todos los tejidos y órganos con la excepción de las fibras musculares esqueléticas (Jänig y McLachlan, 1992b). Esta inervación produce una modulación involuntaria de la actividad de los órganos y tejidos.

De acuerdo con los conceptos modernos acerca de la organización funcional del SNA, las neuronas que participan en la función autonómica están ubicadas tanto en el sistema nervioso central (constituyendo la red neural autonómica central) como en el sistema nervioso periférico (Barron y Chokroverty, 1993).

Las neuronas autonómicas centrales se localizan en niveles supraespinales del sistema nervioso central (SNC) donde se encuentran, fundamentalmente concentrados en el hipotálamo (que es la región cerebral de mayor importancia para la regulación del medio interno) y en distintas regiones del tronco del encéfalo, los núcleos que controlan la actividad autonómica. El hipotálamo funciona en comunicación recíproca con las estructuras que componen el sistema límbico y que incluyen al lóbulo límbico de la corteza cerebral (Kupfermann, 1991). Esto muestra que, aunque no se ha descrito hasta el momento la existencia de una corteza "visceromotora", indirectamente el córtex interviene en la regulación emocional o afectiva de la función autonómica.

El control central de la actividad autonómica se basa en gran medida en el funcionamiento de arcos reflejos: los núcleos reciben (por vía neural o humoral) información aferente sobre el estado de las variables fisiológicas, procesan esta información y emiten las señales adecuadas a través de proyecciones descendentes que activan la vía motora eferente del SNA.

Las neuronas periféricas del SNA se agrupan en ganglios y se las denomina ganglionares o postganglionares (término que usaremos en esta Tesis); sus axones inervan directamente a los órganos blanco. La actividad de estas neuronas se controla por las neuronas

preganglionares cuyos cuerpos se ubican en el SNC y cuyos terminales hacen sinapsis con las dendritas y soma de las postganglionares. Estas dos poblaciones de neuronas en serie constituyen la vía eferente o motora del SNA (Cardinali, 1995).

El fisiólogo J. N. Langley (Jänig y MacLachlan, 1992a) estableció los conceptos clásicos según los cuales el SNA es separado en tres divisiones (Figura 1): el Sistema Simpático, cuyas neuronas preganglionares se localizan en segmentos torácicos y lumbares altos de la médula espinal; el Sistema Parasimpático, con neuronas preganglionares ubicadas en el tronco del encéfalo y en la médula espinal sacra; y el Sistema Nervioso Entérico, un plexo neural que se extiende prácticamente todo a lo largo de las paredes del tracto gastrointestinal.

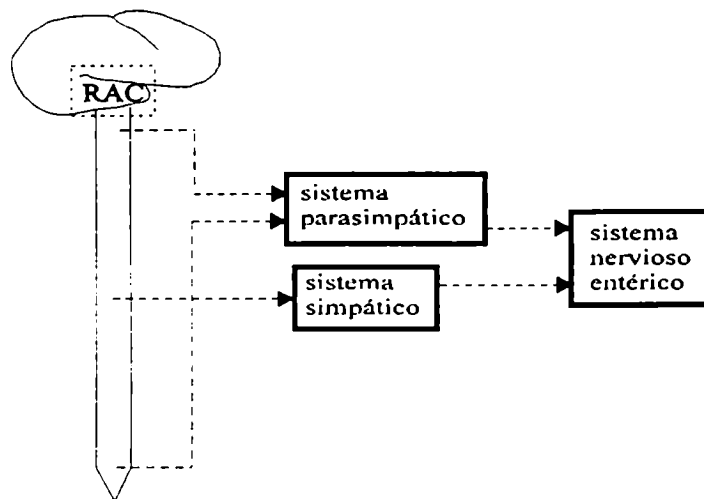


Figura 1. Representación esquemática de las divisiones clásicas del sistema nervioso autónomo. El simpático recibe comandos motores originados en la Red Neural Autónoma Central (RAC) a través de las regiones torácica y lumbar de la médula espinal, el parasimpático desde las regiones craneal y sacra. El sistema nervioso entérico se extiende a lo largo del tubo digestivo y aunque puede funcionar independientemente, recibe influencias desde las otras dos divisiones.

Las principales acciones de los sistemas simpático y parasimpático se resumen en la Tabla 1. Las funciones de los sistemas parasimpático y entérico no serán tratadas en esta Introducción, aquí sólo nos referiremos a la función general del sistema simpático.

Los estudios iniciados a principios de este siglo por W. B. Cannon, extendieron la idea ya clásica de que el sistema simpático está diseñado para preservar la homeostasis en condiciones extremas (como el estrés y el ejercicio) funcionando *in toto*, en una manera "todo o nada" y movilizandando las reservas de energía del organismo (Jänig y McLachlan, 1992a).

Esta visión generalista está representada en la respuesta de lucha y huida o conducta de defensa, paradigma de la activación simpática, que consiste en la activación simultánea y difusa de varias reacciones "simpático-adrenales" tales como: dilatación de la pupila, piloerección, aumento de la presión sanguínea con vasodilatación en los músculos esqueléticos, aumento de la frecuencia cardíaca, sudoración, inhibición de los movimientos del tubo digestivo y otras.

Tabla 1. Efecto de la activación de los sistemas simpático y parasimpático sobre la actividad de algunos de los órganos blanco en los vertebrados.

ORGANO	estimulación simpática	estimulación parasimpática
músculo cardíaco	aumento de la frecuencia de contracción	disminución de la frecuencia de contracción
arterias de la piel y mucosas	constricción	-----
arterias de los músculos esqueléticos	dilatación	-----
arterias cerebrales	constricción	dilatación (?)
venas en general	constricción	-----
esfínteres en el sistema digestivo	contracción	relajación
cápsula del bazo	contracción	-----
sistema reproductivo masculino	contracción del vas deferens y de las vesículas seminales eyaculación	dilatación de las arterias del pene, erección
sistema reproductivo femenino	relajación o contracción (durante el embarazo) del útero	-----
músculo dilatador de la pupila	contracción	-----
músculo constrictor de la pupila	-----	contracción
músculo ciliar	relajación	contracción
células adiposas	lipólisis	-----
hígado	glucogenólisis, gluconeogénesis	glucogenogénesis
músculo bronquial	relajación	contracción
glándulas bronquiales	inhibición	estimulación
glándulas sudoríparas	estimulación	-----

Datos tomados de: Manual de Fisiología, Cardinali, D. P. Edición del autor (1993) y de: Physiology, Berne, R. M. y Levi, Mosby Year Book, (1993).

La conducta de defensa es ejemplo de lo que algunos investigadores llaman homeostasis reactiva, incluyendo a todas las acciones correctivas que se producen en respuesta a perturbaciones impredecibles en las variables del medio interno o del medio ambiente (Moore-Ede, 1986).

Esta respuesta generalizada es representativa de lo que ocurre en condiciones de estrés, pero se supone que la mayoría de las variables fisiológicas moduladas por el sistema simpático son reguladas por éste en forma especializada e independiente durante la actividad "normal", fuera de los periodos excepcionales y generalmente cortos de estrés o exigencia extrema. Como veremos a continuación, un ejemplo de esto lo constituyen las variaciones cíclicas de un gran número de estas funciones.

Muchas de las variables ambientales que afectan a los organismos vivos fluctúan en forma cíclica o periódica, por lo cual sus cambios son temporalmente predecibles. Entre estas la que tal vez, en el curso de la evolución, ha ejercido la mayor influencia sobre la fisiología de los organismos vivos es el ciclo luz : oscuridad diario y sus variaciones anuales o estacionales (la longitud del período de luz o fotoperíodo).

Se postula que esta influencia llevó a la aparición en muchas variables biológicas, de cambios rítmicos acordes a los ciclos geofísicos mencionados. Los ritmos biológicos diarios son llamados circadianos y los ritmos estacionales, circanuales. Los ritmos biológicos se generan por mecanismos fisiológicos endógenos: un reloj y un calendario biológicos, que operan con períodos cercanos ("circa"), respectivamente, a 24 hs o 365 días, y son sincronizados a esos valores exactos de período por el ciclo luz-oscuridad (Cardinali y col., 1992).

En los mamíferos, el reloj biológico está localizado en los núcleos supraquiasmáticos (NSQ) del hipotálamo (Moore, 1983), la actividad de sus neuronas oscila en forma autónoma con un período cercano a 24 hs. y su destrucción elimina gran parte de los ritmos circadianos. Uno de estos ritmos circadianos es el de secreción de melatonina por la glándula pineal. Esta hormona se secreta rítmicamente con valores máximos durante la fase de oscuridad pero, además, la duración del pulso nocturno de melatonina en sangre está directamente relacionada con la duración del período de oscuridad, que varía estacionalmente. Se ha demostrado que en muchos vertebrados, para la actividad del calendario biológico es necesaria la integridad de la glándula pineal (Reiter, 1991), sugiriendo que el reconocimiento fisiológico de los cambios estacionales de la duración del fotoperíodo está mediado por esta glándula y se realiza sobre la base de la modificación estacional del patrón circadiano de secreción de melatonina (Reiter, 1991).

La capacidad de predecir y anticipar los cambios periódicos confiere la ventaja de poder optimizar temporalmente las funciones fisiológicas. Son ejemplos el ciclo diario de actividad - reposo de los animales en general o los ciclos reproductivos anuales de las especies estacionales, los que se sincronizan con el "momento ecológico favorable" del día o del año, respectivamente. Estas respuestas anticipatorias o predictivas constituyen los mecanismos denominados de homeostasis predictiva (Moore-Ede, 1986).

Distintas evidencias indican que el sistema simpático es parte activa de la vía de acoplamiento entre el reloj circadiano y los efectores de los ritmos biológicos o que directamente es un efector en sí mismo. La actividad de numerosos órganos que reciben inervación simpática muestra variaciones circadianas: secreción de melatonina y expresión de c-fos por la pineal (Binkley, 1983; Carter, 1990), presión intraocular (Bar-Ilan, 1984), secreción de hormonas de la hipófisis (Jordan y col., 1980; Cardinali y col., 1986; Siaud y col., 1994), metabolismo de neurotransmisores en las glándulas tiroideas y salivales (Barontini y col., 1988), contenido de neuropéptido Y en el órgano ciliar (Otori y col., 1993), capacidad de contraerse del conducto deferente (Carneiro y col., 1991), función cardiovascular (Marchant y col., 1994; Warren y col., 1994). En todos los casos reportados hasta el momento, estas variaciones circadianas son modificadas o eliminadas tras la desnervación simpática del órgano efector (Binkley 1983, Gregory y col., 1985; Cardinali y col., 1986; Carter, 1990; Siaud y col., 1994; Warren y col., 1994), indicando que la inervación simpática normal es necesaria para el mantenimiento de estos ritmos diarios.

Papel de los ganglios periféricos en la fisiología del sistema simpático.

De lo enunciado hasta aquí podemos concluir que las funciones autonómicas (reactivas o predictivas) se integran en niveles centrales superiores (hipotálamo, tronco del encéfalo) y se

ponen en marcha a través de la vía motora eferente del SNA, por medio de la inervación directa de los órganos efectores que se origina en las neuronas postganglionares.

Los ganglios autonómicos son los sitios periféricos donde estas neuronas reciben, a través de sinapsis con las neuronas preganglionares, la información integrada por los sistemas centrales; la regulación de esta interacción sináptica es el objeto de estudio central de este trabajo de Tesis.

Clásicamente los ganglios del SNA fueron vistos por los fisiólogos como simples estaciones de relevo sináptico, limitadas a la transmisión centrífuga de los comandos centrales hacia los efectores (Bulygin, 1983; Smith, 1993, 1994). Sin embargo, al presente numerosas evidencias sugieren que los ganglios autonómicos son relativamente complejos en su organización estructural y funcional (Cardinali y col., 1981; Bulygin, 1983; Smith, 1993, 1994), y que tienen la capacidad de integrar información y modificar o regular el flujo de las señales centrales hacia la periferia.

Este concepto se aplica principalmente a los ganglios simpáticos. Los ganglios del sistema parasimpático están en general menos estudiados (Skok, 1980; Janig y McLachlan, 1992b), en parte porque están menos definidos anatómicamente: sus neuronas suelen estar dispersas en la pared del tejido efector y/o ser de difícil identificación y acceso (Janig y McLachlan, 1992b). Por otra parte, los ganglios parasimpáticos mejor estudiados parecen funcionar verdaderamente como estaciones de relevo sináptico (Janig y McLachlan, 1992b).

En los ganglios simpáticos la transmisión del impulso nervioso está mediada por la liberación de acetilcolina (ACh) desde los terminales preganglionares y la activación de receptores nicotínicos en la postsinapsis (Skok, 1980). Distintas pruebas experimentales sustentan la hipótesis general de que la transmisión colinérgica ganglionar puede ser modificada por la integración de distintos tipos de información, entre ellas:

- i) en los mamíferos, la mayoría de las neuronas ganglionares son inervadas por varias fibras preganglionares (Skok, 1980) y su actividad resulta de la integración espacial y temporal de estas múltiples señales de entrada (Skok, 1980; Ivanov y Skok, 1992).
- ii) a muchos ganglios llegan terminaciones de fibras aferentes con información sensorial desde los órganos periféricos (Skok, 1980; Bulygin, 1983; Janig y McLachlan, 1992a), las cuales modulan la transmisión ganglionar constituyendo verdaderos arcos reflejos periféricos (Bulygin, 1983; Smith, 1993).
- iii) la eficacia de la transmisión ganglionar puede ser modulada en una forma actividad - dependiente (Dunant y Dolivo, 1968; Zengel y col., 1980; Brown y McAfee, 1982; Koyano y col., 1985; Bachoo y Polosa, 1991; Scott y Bennett, 1993) (en secciones posteriores nos referiremos con mayor detalle a este fenómeno).
- iv) la actividad de ciertos ganglios simpáticos es sensible al efecto de distintas hormonas circulantes, por lo cual posiblemente tengan funciones de integración neuroendocrina (Cardinali y col., 1981; Landa y col., 1991; Carneiro y col., 1994; Stern y Cardinali, 1994).
- v) está bien documentada la presencia de diversos putativos neurotransmisores o neuromoduladores no colinérgicos que se sintetizan localmente en células neurales y no neurales. Para muchos de ellos se han descritos efectos significativos.

Los ganglios del sistema simpático se dividen desde un punto de vista anatómico-funcional en dos grandes grupos: prevertebrales y paravertebrales, estos últimos forman dos cadenas ganglionares ubicadas en el sentido rostral - caudal, a ambos lados de la médula espinal.

Ciertos órganos efectores del sistema simpático, como los vasos sanguíneos (de la piel, músculo esquelético y vísceras), las glándulas sudoríparas y los músculos piloerectores tienen una distribución espacial amplia (Janig y McLachlan, 1992b; Harati, 1993) y en cada nivel metamérico son inervados por los ganglios anatómicamente correspondientes. Por el contrario, muchos otros órganos blanco están espacialmente restringidos y son inervados por ganglios cuyas neuronas se activan específicamente en función de los requerimientos homeostáticos.

Debido a las influencias retrógradas que ejercen los órganos blanco sobre las neuronas que los inervan (Dibner y col., 1977; Voyvodic, 1989; Schotzinger y col., 1990, 1994) es posible que, a través del tipo de órgano inervado, la ubicación metamérica determine el desarrollo de propiedades fisiológicas particulares en cada ganglio (Ivanov, 1991), ya sean morfológicas, biofísicas, neuroquímicas o de otro tipo.

El ganglio cervical superior (GCS) es frecuentemente usado como modelo de ganglio simpático en distintos diseños experimentales. Sin embargo, en su territorio de inervación se localizan en forma exclusiva estructuras diversas y de gran relevancia fisiológica, lo cual sugiere la existencia de un grado importante de especialización funcional. Estas consideraciones particulares sobre la fisiología del GCS serán abordadas en la sección siguiente.

El ganglio cervical superior: consideraciones anatómicas y funcionales

El GCS es el primer ganglio de la cadena simpática paravertebral (Figura 2A). En la región cervical donde se ubica, no existen conexiones anatómicas directas (ramos comunicantes) con la médula espinal (Harati, 1993); en consecuencia, los axones preganglionares alcanzan al GCS desde el tronco simpático cervical (TSC) (Fig. 2A). Las fibras postganglionares salen del ganglio principalmente por los nervios carotídeos externo e interno (Fig. 2B).

Aproximadamente 1000 neuronas preganglionares ubicadas en la región intermediolateral de la sustancia gris de los segmentos T1 a T3 de la médula espinal (Rando y col., 1981; Bachoo y Polosa, 1992a; Pyner y col., 1994b) inervan el GCS de rata a través del TSC (Pyner y Coote, 1994a,b). La mayoría de estas neuronas (~ 75 %) proyectan sólo al GCS (Pyner y Coote, 1994b), el resto diverge e inerva además a otros ganglios simpáticos (Pyner y Coote, 1994b).

Las neuronas preganglionares simpáticas reciben información descendente desde los centros supraespinales que regulan la función autonómica y también información aferente sensorial, visceral y somática (Dun y col., 1992). *In vivo*, en animales anestesiados, los axones del TSC muestran actividad espontánea y refleja que responde a distintos estímulos o cambios en variables fisiológicas, tales como: cambios de la presión arterial (algunos axones tienen ritmicidad cardíaca), estimulación directa de los receptores de presión arteriales, el ciclo inspiración-expiración (ritmicidad respiratoria), estimulación dolorosa de la piel, cambios de la concentración de CO₂ en la sangre, iluminación de la retina (Gilbey y col., 1986; Numao y Gilbey, 1987; Boczek-Funcke y col., 1992a,b; 1993).

Un porcentaje de las fibras del TSC, variable entre 35 y 70 % según distintos autores (Polosa, 1968; Janig y Schmidt, 1970; Skok, 1980; Boczek-Funcke y col., 1992, 1993) son silenciosas, es decir no tienen actividad espontánea ni refleja en los animales anestesiados.

El GCS aparentemente distribuye señales circadianas originadas en el reloj hipotalámico hacia distintos efectores (Binkley, 1983; Bar-Ilan, 1984; Cardinali y col., 1986; Carter 1990; Siaud y col., 1994), lo cual permite predecir que al menos una parte de los axones preganglionares en el TSC tengan variaciones de 24 hs. en su actividad, sin embargo, esta idea

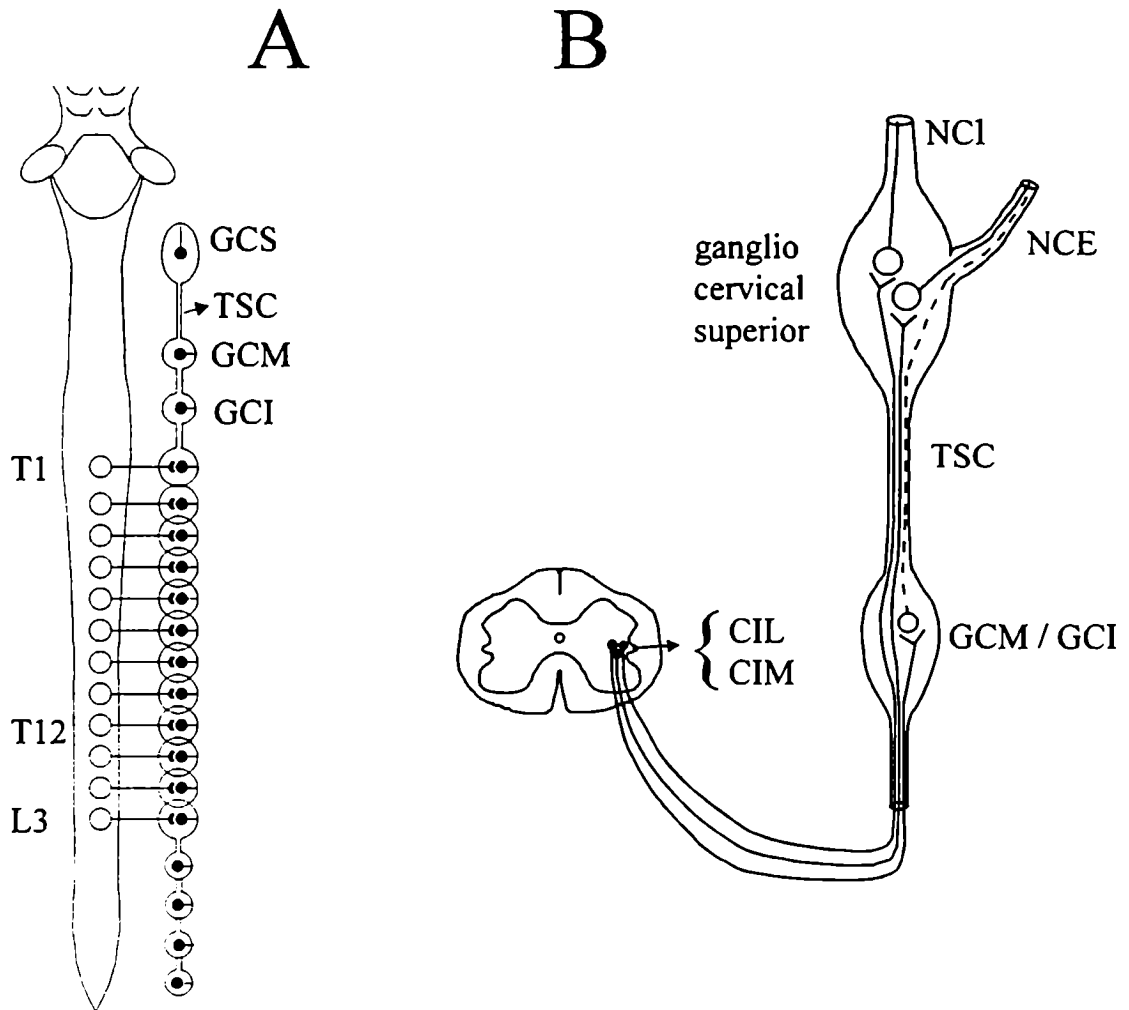


Figura 2. (A) Dibujo esquemático de la médula espinal y la cadena de ganglios paravertebrales del sistema simpático, mostrando la ubicación del ganglio cervical superior (GCS) y los otros ganglios de la región cervical (GCM, cervical medio y GCI, cervical inferior). (B) A través del tronco simpático cervical (TSC), al GCS llegan fibras de neuronas preganglionares ubicadas en las columnas intermediolateral (CIL) e intermedio medial (CIM) de la sustancia gris medular y también fibras de neuronas postganglionares (con línea punteada) situadas en el GCM y/o GCI. Los axones postganglionares dejan el GCS a través de los nervios carotídeos interno y externo (NCI y NCE).

no ha sido examinada experimentalmente hasta el momento.

En el sistema simpático, las fibras preganglionares son colinérgicas y mielínicas en tanto que las postganglionares son noradrenérgicas y amielínicas (Skok, 1980). En ratas, el TSC contiene fibras mielinizadas y no mielinizadas (Dunant, 1967; Wolff y col., 1993), la mayor parte de estas últimas desaparece después de eliminar en forma generalizada a las neuronas adrenérgicas por simpatectomía química (Zochodne y col., 1989), lo que sugiere que estas

fibras son axones noradrenérgicos postganglionares. Ciertamente, neuronas noradrenérgicas ubicadas en los ganglios cervicales medio e inferior envían axones hacia los órganos blanco a través del TSC y el GCS (Bowers y Zigmond, 1981). Estos axones (llamados en inglés "through fibers") entran al ganglio, lo atraviesan y salen del él fundamentalmente a través del nervio carotídeo externo (Bowers y Zigmond, 1981) (Fig. 2B, línea punteada).

La actividad presináptica es estrictamente necesaria para la función de las neuronas del GCS. Tras la sección quirúrgica o durante la aplicación de tetrodotoxina al nervio preganglionar (Weldon y col., 1994b) las neuronas ganglionares permanecen inactivas y la modulación simpática de los órganos inervados por ellas desaparece, tal como lo demuestran el retraimiento del ojo (enofthalmia) y caída del párpado (ptosis palpebral) o la pérdida de la función pineal (Zigmond y col., 1985), que se producen en estas condiciones.

El GCS en ratas contiene unas 30000 a 35000 neuronas postganglionares (Smolen, 1983; Flett y Bell, 1990), es el ganglio de mayor tamaño de la cadena paravertebral (en el hombre el GCS tiene aproximadamente 10^6 neuronas; Ebbeson, 1963) la cual exhibe por lo tanto cierto grado de "cefalización", ciertamente el GCS es considerado como un "pequeño cerebro" periférico (Cardinali y Romeo, 1991; Smith, 1993).

La relación numérica entre neuronas pre y postganglionares en el GCS sigue el patrón general observado en el sistema simpático, en rata es aproximadamente 1 : 30, lo cual implica un alto grado de divergencia en las conexiones sinápticas.

Mediante la inyección de marcadores retrógrados en los distintos órganos blanco se han identificado los cuerpos celulares de las neuronas órgano-específicas (Ivanov, 1991; Luebke y col., 1992) y se ha estudiado su localización espacial dentro de la estructura del GCS (Bowers y Zigmond, 1979; Bowers y col., 1984; Flett y Bell, 1991; Luebke y Wright, 1992). Aunque no se observa un agrupamiento topográfico específico, las neuronas no están distribuidas en forma difusa o dispersa; por el contrario, siguen una distribución rostrocaudal acorde con la posición de los blancos inervados y del nervio (NCI o NCE) hacia el que proyectan. Esta distribución topográfica se encuentra indicada en la Figura 3.

Con el marcado retrógrado doble no se han observado, en el GCS, neuronas que inerven dos blancos a la vez (Flett y Bell, 1991), aunque estén muy próximos entre sí. Esto sugiere que las vías simpáticas originadas en el GCS son anatómicamente independientes, lo cual posibilita el control selectivo de la función de los efectores (Gibbins, 1991). La existencia de vías funcionales especializadas en el sistema simpático (Janig y McLachlan, 1992a,b) parece no limitarse entonces a la activación específica de niveles metaméricos, sino que también se aplica a la organización interna de cada ganglio. En el GCS esta especialización es de gran importancia dada la heterogeneidad funcional de los órganos que inerva.

En la Figura 3 se esquematizan los distintos tipos de órganos blanco inervados por neuronas del GCS, como mencionamos anteriormente las fibras emergen fundamentalmente a través de los nervios carotídeos externo (NCE) e interno (NCI).

Aparte de los terminales preganglionares y las neuronas principales ganglionares ya mencionados, en el GCS existen otros componentes celulares:

- i) células del tejido conectivo que constituyen las vainas conectivas
- ii) células gliales (células satélite y de Schwann)
- iii) células tipo cromafín o SIF (small intensely fluorescent cells)
- iv) mastocitos
- v) células del tejido vascular.

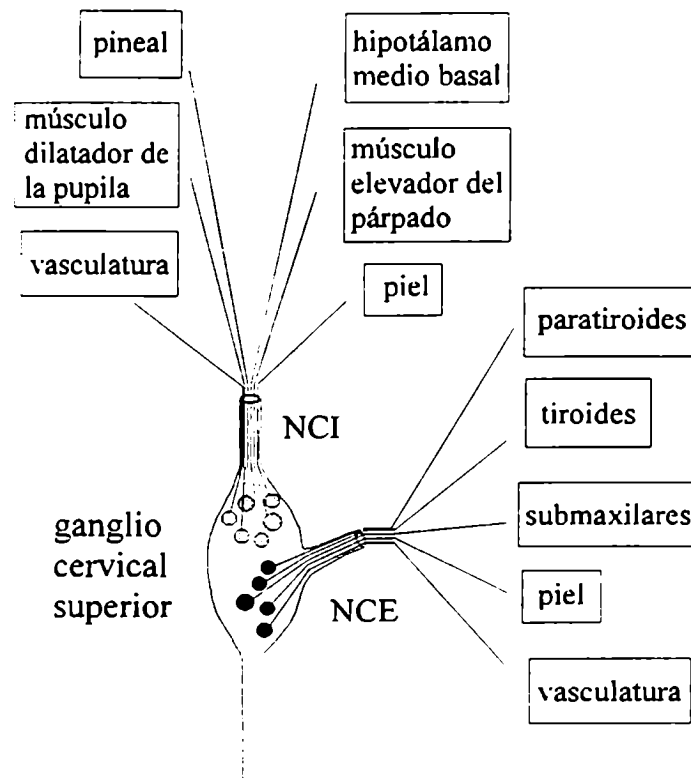


Figura 3. Representación esquemática de la inervación de alguno de los tejidos blanco por las neuronas del GCS. Las células que proyectan via el NCI y el NCE (los dos troncos nerviosos postganglionares principales) tienden a agruparse en las regiones rostral y caudal del ganglio, respectivamente. No se muestran las "through fibers" que atraviesan el ganglio sin hacer sinapsis (ver Figura 2) y salen por el NCE para inervar por ejemplo, a la tiroides.

En general se acepta que estos elementos cumplen en los ganglios roles parecidos a los que desarrollan en el resto del sistema nervioso. Algunas posibles funciones de la glia, células SIF y mastocitos en el GCS serán discutidas posteriormente.

El GCS de rata está densamente irrigado por ramificaciones de la arteria carótida común y externa (Chunhabundit y col., 1992). Las redes de arteriolas y capilares se distribuyen homogéneamente dentro del ganglio (Chunhabundit y col., 1992) y además se ha descrito la existencia de sistemas intraganglionares de circulación tipo portal (Mekhail y col., 1990). Estos datos sugieren que los mensajeros químicos extracelulares (sintetizados fuera o dentro del ganglio) pueden acceder con relativa facilidad a las células de las distintas regiones del ganglio para eventualmente modificar su actividad.

La transmisión sináptica ganglionar es mediada por acetilcolina.

La identidad de la ACh como el neurotransmisor en las sinapsis de los ganglios simpáticos ha sido establecida tiempo atrás (Feldberg y Gaddum, 1934). Esta es una propiedad general de los ganglios autonómicos, en los que la transmisión es exclusivamente química con la excepción de unos pocos, como el ganglio ciliar, que poseen además sinapsis eléctricas (Martin y Pilar, 1963). En la Figura 4 se detallan las distintas etapas y mecanismos involucrados en la transmisión colinérgica en el GCS, los cuales discutiremos a continuación.

La ACh se sintetiza en los terminales sinápticos de las neuronas preganglionares a partir de acetil-coenzima A (acetil-CoA) y colina en una reacción catalizada por la enzima colina acetil transferasa (CAT). La acetil-CoA deriva principalmente del piruvato que se genera por metabolismo oxidativo de la glucosa; la colina que se utiliza para la síntesis de ACh proviene del medio extracelular, desde donde es captada por transportadores específicos de la membrana del terminal (Tucek, 1985).

La enzima CAT se localiza en el citoplasma de los terminales y posee Km's de 0.4-1.0 mM para colina y 7-16 μ M para acetil-CoA (Tucek, 1985). La medición precisa de las concentraciones intraterminal de estos precursores es dificultosa y hasta donde sabemos no se ha realizado en los terminales preganglionares simpáticos, pero generalmente se acepta que la velocidad de síntesis de la ACh está determinada principalmente por la disponibilidad de colina citoplasmática, estando la acetil-CoA en principio siempre disponible (Tucek, 1985).

La ACh sintetizada en el citoplasma se almacena en vesículas pequeñas por medio de transportadores que se inhiben por ejemplo por el vesamicol (Collier y col., 1986; Marshall y Parsons, 1987; Whittaker, 1990). Algunas de estas vesículas se encuentran "ancladas" hacia la región de las zonas activas de la membrana presináptica (Friesen, 1971; Kadota y col., 1993). El resto de las vesículas pequeñas se encuentran apartadas de las zonas activas y se alternan con vesículas grandes, de centro electrodenso, que contienen neuropéptidos (Weldon y col., 1993, 1994).

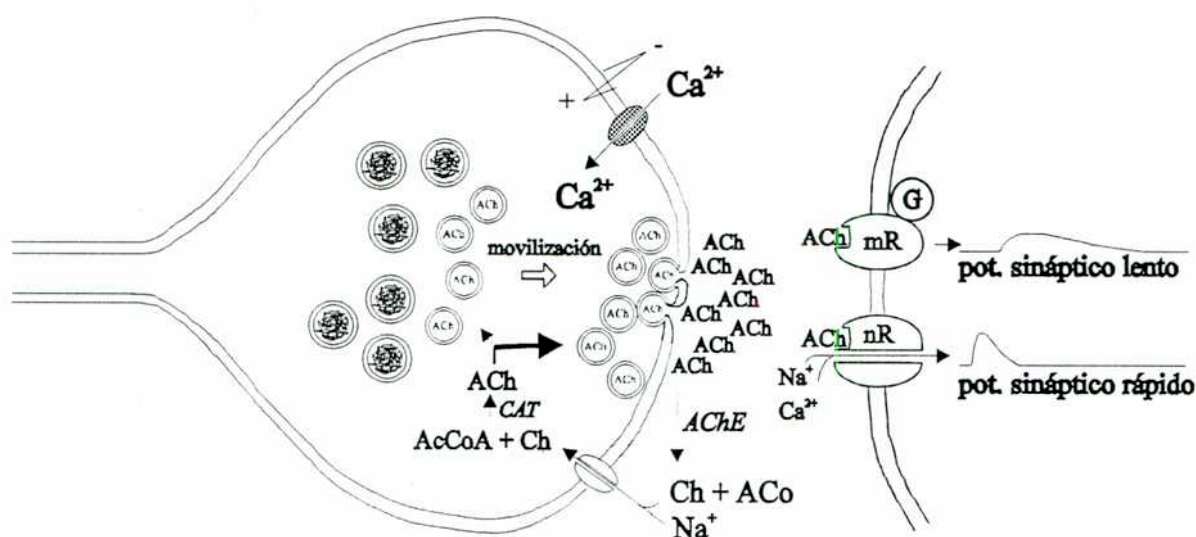


Figura 4. Etapas fundamentales de la transmisión colinérgica en el GCS. Para la explicación ver el texto. Aunque su presencia ha sido sugerida (Wessler, 1989; Alonso-deFlorida y col., 1991), no se muestran receptores colinérgicos presinápticos, tampoco heterorreceptores presinápticos. Se muestran vesículas grandes de centro electrodenso. Abreviaturas: ACh, acetilcolina; Ch, colina; ACo, acetato; AcCoA, acetil coenzimaA; CAT, colina-acetiltransferasa; AChE, acetilcolinesterasa; nR, receptor nicotínico; mR, receptor muscarínico. Modificado de Whittaker, 1990 y de Marshall y Parsons, 1987.

En los terminales del GCS, la ACh se distribuye en al menos dos compartimientos: uno de fácil liberación o activo y otro menos accesible para la liberación o de reserva (Collier y col., 1986). Tras la invasión del terminal por el potencial de acción, la ACh se libera en forma directa sólo desde el compartimiento activo (Prado y col., 1992). Durante la actividad repetitiva la ACh se moviliza desde el compartimiento de reserva hasta el activo, en un proceso que es bloqueado por el vesamicol (Marshall y Parsons, 1987; Cabeza y Collier, 1988).

De acuerdo con la "hipótesis del calcio" (Katz, 1969) la liberación de los neurotransmisores que se almacenan en vesículas depende de la entrada de Ca^{2+} a través de canales voltaje-dependientes (CCVD) que se activan por la despolarización del terminal. La liberación de ACh desde los terminales del GCS esta de acuerdo con este modelo y se reduce marcadamente en ausencia de Ca^{2+} en el medio extracelular o en presencia de bloqueantes de CCVD tipo N ó P (González Burgos y col., 1995).

La respuesta de la neurona postsináptica a la ACh que se libera al espacio sináptico está determinada principalmente por la activación de receptores nicotínicos de tipo neuronal (Skok, 1980, 1990). Estos receptores, similares a los de la sinapsis neuromuscular, son de tipo ionotrópico y son pentámeros de subunidades α y β las que forman un canal catiónico de permeabilidad dominante para Na^+ , aunque también conduce Ca^{2+} y K^+ (Skok, 1980; Derkach y col., 1987; Trouslard y col., 1993). La d-tubocurarina (principio activo del curare) es antagonista de ambos receptores nicotínicos (muscular y ganglionar) en tanto que el hexametonio es un antagonista selectivo para el receptor ganglionar (Skok, 1990).

La activación de los receptores nicotínicos por la liberación de ACh en la sinápsis genera un potencial postsináptico excitatorio rápido (PPSEr) (Figura 4). Múltiples evidencias indican que la liberación de ACh en las sinapsis del GCS sigue un modelo cuántico (Sacchi y Perri, 1971, 1973, 1976; Skok, 1980), hecho coherente con la presencia de vesículas en dichos terminales. Los valores de contenido cuántico promedio reportados en las sinapsis del GCS son bajos: 1.5 (Sacchi y Perri, 1971) a 4 (Sacchi y Perri, 1973); de manera que la amplitud del PPSEr en cada conexión sináptica por lo usual no es suficiente para generar el disparo de un potencial de acción en la membrana postsináptica (Skok, 1980). Sólo un pequeño porcentaje (5 %) de las conexiones sinápticas del GCS son en, condiciones normales, suficientemente fuertes como para generar un PPSEr supraumbrales (Ivanov y Skok, 1992).

Si bien la proporción entre fibras pre- y neuronas postganglionares en el GCS es 1 : 30, cada fibra se ramifica e inerva un número de neuronas mayor (200 a 400; Skok, 1980; Ivanov y Skok, 1992) al que resulta de la relación numérica. Por otra parte, cada neurona recibe conexiones sinápticas de varias fibras preganglionares: entre 10 y 30 fibras convergen sobre cada neurona postganglionar en el GCS (Sacchi y Perri, 1976; Skok, 1980). Como se muestra esquemáticamente en la Figura 5, en el GCS hay un alto grado de divergencia y de convergencia.

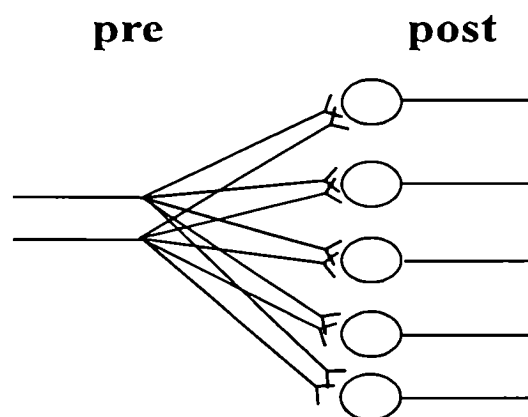


Figura 5. Representación esquemática de la divergencia y convergencia en el GCS. La relación numérica entre neuronas pre y postganglionares es $\sim 1:30$. Cada fibra preganglionar (pre) se ramifica y hace contacto con unas 200 neuronas postganglionares (post). Cada neurona postganglionar recibe terminales desde 10-30 fibras preganglionares. En el ejemplo los valores absolutos no son los reales: la relación es 1:2.5; cada fibra pre-contacta 5 neuronas postganglionares, cada neurona recibe contacto desde 2 terminales.

Las neuronas postganglionares integran las señales de entrada que reciben desde múltiples conexiones sinápticas. Se ha estimado que al menos 8 de las fibras preganglionares que inervan a cada neurona ganglionar deben disparar simultáneamente para que una célula postganglionar promedio alcance el umbral de disparo (Sacchi y Perri, 1971; Skok, 1980).

En el GCS se detectan niveles considerables de actividad enzimática acetilcolinesterasa (AChE; Gisiger y col., 1978; Klingman, 1980). La AChE se localiza en el espacio extracelular (Figura 4) aunque no parece estar especialmente concentrada en la brecha sináptica. El efecto de los inhibidores de esta enzima sobre la transmisión ganglionar (Volle, 1980a) sugiere que la AChE participa en la terminación de la acción sináptica de la ACh.

La hidrólisis de la ACh produce colina y acetato en el espacio sináptico y, tal como se mencionó antes, la colina es captada por transportadores específicos en la membrana presináptica (Figura 4) que se inhiben con concentraciones bajas de hemicolinio-3 (HC-3, Sacchi y Perri, 1973, 1976; Tucek, 1985). En el GCS (Katz y col., 1973), igual que en el SNC, nunca se ha podido demostrar la presencia de mecanismos de recaptación de ACh como tal hacia los terminales. Si el transporte de colina se inhibe en forma sostenida por la presencia continua de HC-3, la liberación de ACh disminuye paulatinamente hasta que la transmisión se agota por depleción del transmisor, debida a la falta de la colina necesaria para su síntesis en la presinapsis (Sacchi y Perri, 1973, 1976). La hidrólisis de la ACh provee de la colina necesaria y suficiente para la resíntesis en el terminal. Experimentalmente, el agregado de colina exógena sólo es necesario si está farmacológicamente inhibida la AChE (Sacchi y col., 1978).

Aunque la respuesta postsináptica de las neuronas postganglionares está determinada por la activación de los receptores nicotínicos, numerosas evidencias experimentales demuestran la presencia de receptores muscarínicos para ACh en los ganglios simpáticos (Brown, 1980; Brown y col., 1980; Cole y Shinnick-Gallagher, 1984; Brown y Selyanko, 1985; Smith, 1993, 1994). El rol fisiológico de estos receptores no está aún totalmente aclarado, pero en general se acepta que su activación por la ACh endógena puede tener consecuencias modulatorias para la excitabilidad de las neuronas postganglionares (Smith, 1993, 1994).

Las señales mediadas por activación de los receptores muscarínicos son a veces denominadas potenciales postsinápticos lentos (Dunant y Dolivo, 1967; Libet, 1992) (Figura 4). Estos potenciales están muy bien caracterizados en los ganglios simpáticos de anfibios (Smith, 1993, 1994). En mamíferos, para visualizar experimentalmente la activación de los receptores muscarínicos, se requiere: la estimulación repetitiva de las fibras preganglionares (Cole y Shinnick-Gallagher, 1984; Brown y Selyanko, 1985; Libet, 1986, 1992) y la presencia de inhibidores de la AChE o de bloqueantes nicotínicos (Cole y Shinnick-Gallagher, 1984; Brown y Selyanko, 1985; Bachoo y Polosa, 1992a).

Aun no está claro si la activación de receptores muscarínicos contribuye, momento a momento, a la transmisión ganglionar (Ivanov y Skok, 1992); los efectos mejor descritos de la activación de estos receptores en los ganglios simpáticos de mamíferos son:

1) Excitación muscarínica o PPSE lento.

Mediados por la activación de receptores muscarínicos M₁, que a través de un efecto ligado a proteína G y a algún mensajero intracelular difusible (posiblemente Ca²⁺; Beech y col., 1991) producen el cierre de los canales de K⁺ voltaje-dependientes responsables de la corriente I_M, una corriente de K⁺ que está activa al potencial de reposo y que tiende a mantener hiperpolarizada la membrana celular (Brown y Selyanko, 1985; Libet 1986, 1992; Smith, 1993, 1994). La supresión de la corriente I_M, aumenta la probabilidad de disparo de potenciales de acción, induciendo o facilitando la descarga repetitiva (Brown y Selyanko, 1985). En las neuronas ganglionares de anfibios se observa también un PPSE muy lento o lento retardado

que debido al cierre de la corriente IM por acción de un péptido similar a la LHRH; en mamíferos se han reportado ocasionalmente respuestas similares (Ashe y Libet, 1981) pero la identidad del supuesto péptido mediador es al presente desconocida (posiblemente sustancia P; Elfvin y col., 1993).

2) Inhibición muscarínica o PPSI lento.

Mediados por activación de receptores M₂ (Newberry, 1988) posiblemente a través de la acción directa de una proteína G. Este efecto muscarínico se asocia a un aumento de la conductancia para K⁺, probablemente debido a la activación de canales de K⁺ voltaje-dependientes diferentes de los anteriores (Cole y Shinnick-Gallagher, 1984; Smith, 1993, 1994). Estos canales conducen con "dificultad" al K⁺ hacia afuera lo cual los hace resistentes a los cambios en el gradiente electroquímico para el K⁺ que pueden producirse tras la acumulación de K⁺ extracelular por actividad neuronal intensa (Smith, 1994). Este mecanismo provee un medio efectivo para inhibir el disparo repetitivo de potenciales de acción. El posible rol de la dopamina en la génesis del PPSI lento (Dun, 1978, 1980) se discutirá en una sección posterior.

En los ganglios de anfibios la inhibición o excitación muscarínicas se observan en forma mutuamente excluyente en distintas células (Smith, 1993, 1994); en mamíferos esto probablemente sea similar, pero aun no está claro.

Modulación de la transmisión en el ganglio cervical superior: mecanismos actividad-dependientes.

En 1968 Dunant y Dolivo (Dunant y Dolivo, 1968a) mostraron por primera vez que tras un período breve de actividad repetitiva, la transmisión sináptica en el GCS de rata experimenta una potenciación de duración significativamente mayor que la de la potenciación post-tetánica clásica (Dunant y Dolivo, 1968a). Posteriormente distintos grupos extendieron el estudio de esta forma de plasticidad sináptica llegando a una caracterización relativamente avanzada del fenómeno (Brown y McAfee, 1982; Briggs y col., 1985a,b; Birks e Isacoff, 1988; Briggs y col., 1988a,b; Alonso de-florida y col., 1991; Bachoo y Polosa, 1992a,b,c). En otros ganglios autonómicos (Bachoo y col., 1991) inclusive de vertebrados no mamíferos (Koyano y col., 1985; Scott y Bennett, 1993) se describieron mecanismos similares a la potenciación de la transmisión en el GCS.

Esta potenciación es aparentemente exclusiva de la transmisión nicotínica, dado que no se afecta por la presencia de atropina, que antagoniza todas las respuestas muscarínicas conocidas en el GCS. La potenciación se expresa como un aumento significativo de la amplitud y la pendiente del potencial sináptico excitatorio nicotínico (Briggs y McAfee, 1988) el cual tras la estimulación tetánica en muchos casos pasa a superar el umbral de disparo de la neurona postganglionar (Briggs y McAfee, 1988). En la mayoría de los estudios publicados (y también en esta Tesis) la potenciación se midió mediante electrodos extracelulares, como un aumento en el reclutamiento en la población de neuronas postganglionares (Brown y McAfee, 1982; Briggs y col., 1985a).

Algunas de las características básicas de la potenciación de largo plazo de la transmisión ganglionar se resumen en el esquema de la Figura 6. Tras la estimulación tetánica, la potenciación decae espontáneamente en forma exponencial siguiendo al menos dos componentes (Figura 6A): potenciación de corto plazo y potenciación de largo plazo. Con una constante de tiempo de unos pocos minutos, la potenciación de corto plazo es probablemente similar a la potenciación post-tetánica clásica observada en muchas otras sinapsis. La potenciación de largo plazo, en contraste, decae con una constante de tiempo mucho mayor,

en el orden de horas. Para distinguirlas, estas dos fases de la potenciación son comunmente denominadas PTP (del inglés, Post-Tetanic Potentiation) y LTP (por Long-Term Potentiation) (Brown y McAfee, 1982; Briggs y col., 1985a), términos que adoptaremos en este Trabajo.

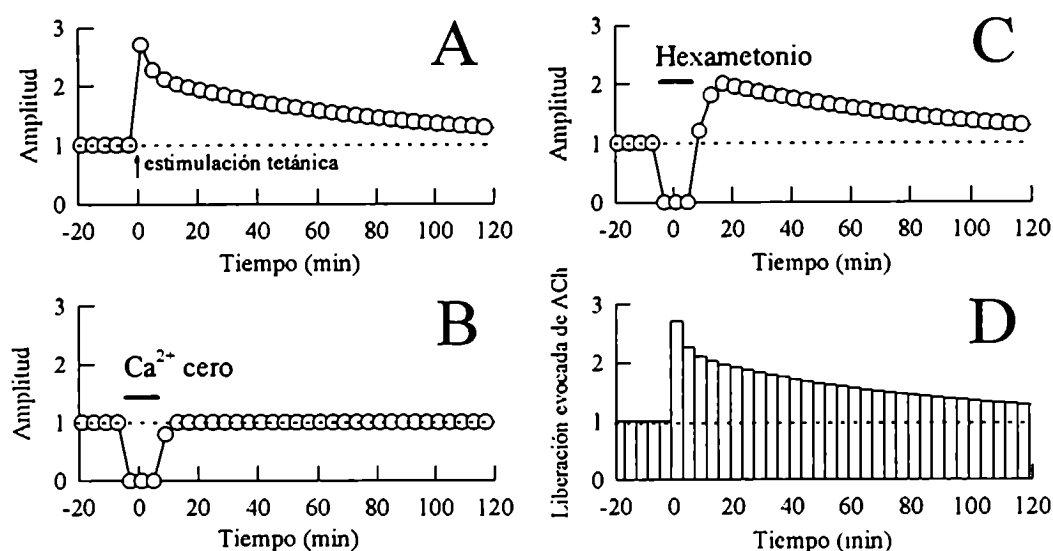


Figura 6. Cuatro características básicas de la potenciación de largo plazo (LTP) de la transmisión ganglionar. (A) La estimulación tetánica produce una potenciación que decae siguiendo dos componentes exponenciales. (B) La inducción de potenciación se previene al aplicar la tetanización durante el bloqueo por ausencia de calcio. (C) El bloqueo total de la transmisión por hexametonio (y atropina, no mostrada en el gráfico) no previene la inducción de LTP (D) La potenciación se acompaña de un aumento de la liberación evocada de ACh que sigue una cinética de decaimiento similar a la de la señal postsináptica. En todos los casos la estimulación tetánica se aplicó al tiempo cero; en A, B y C en ordenadas se grafica la amplitud de la señal postsináptica en unidades arbitrarias, en D se grafica la liberación evocada de ACh al medio de perfusión. Esta figura se construyó en base a los datos de Briggs y col., 1985.

Aunque en ciertas condiciones experimentales (Briggs y col., 1985), la potenciación sináptica ganglionar adopta una forma persistente, sin decaimiento aparente, este mecanismo de plasticidad sináptica es en varios aspectos distinto a la potenciación NMDA-dependiente descrita en sinapsis glutamatergicas centrales (principalmente del hipocampo) donde, como consecuencia de su persistencia, el fenómeno es usualmente considerado como la posible base celular del aprendizaje y la memoria.

Como se muestra esquemáticamente en la Figura 6B, la inducción de potenciación ganglionar por estimulación repetitiva es dependiente de la presencia de Ca²⁺ extracelular. Esta dependencia podría sugerir que la inducción de LTP requiera la liberación (Ca²⁺-dependiente) de ACh, la interacción con receptores postsinápticos y posiblemente la entrada de Ca²⁺ a la célula postsináptica a través de los receptores nicotínicos neuronales que tienen una alta permeabilidad para este catión (Trousard y col., 1993). Sin embargo, se ha demostrado (Briggs y col., 1985a) que la estimulación a alta frecuencia de la presinapsis aplicada durante el bloqueo total de la respuesta postsináptica por antagonistas colinérgicos (hexametonio y atropina), es capaz de inducir LTP normalmente (Figura 6C).

Estas y otras evidencias, llevaron a sugerir que el sitio y mecanismo de inducción de la LTP ganglionar son puramente presinápticos (Briggs y col., 1985a,b) e independientes de la activación de la postsinapsis. Esta propiedad la hace semejante a la LTP NMDA-independiente descrita en las sinapsis entre fibras musgosas y neuronas piramidales de la región CA3 del hipocampo (Weisskopf y col., 1994). Tras la inducción de LTP en el GCS se observa un aumento de largo plazo de la liberación evocada de ACh al medio de perfusión (Figura 6D). En contradicción con resultados previos obtenidos en el GCS de rata (Briggs y col., 1985a; Briggs y McAfee, 1988), recientemente se ha reportado que durante la expresión de la potenciación en el GCS de gatos, se observa un aumento de la respuesta postsináptica a la ACh (Morales y col., 1994), sugiriendo que la expresión de LTP ganglionar puede radicar tanto a nivel pre (aumento de la liberación evocada de ACh) como postsináptico (aumento de la respuesta a la ACh).

En el GCS de rata la LTP es homosináptica, es decir sólo se expresa en las fibras preganglionares que reciben la estimulación repetitiva (Briggs y col., 1985a) sin trasladarse a las fibras adyacentes que permanecen en reposo durante la tetania. Esto sugiere que el mecanismo de inducción es exclusivamente intraterminal y que posiblemente no dependa de la liberación de mediadores químicos durante el protocolo de inducción.

La naturaleza aparentemente presináptica de la potenciación ganglionar indujo a pensar en un comienzo que su expresión estuviese mediada por un aumento del Ca^{2+} residual en el terminal, como ocurre en la facilitación y potenciación post-tetánica clásicas. Sin embargo, si bien en el GCS la estimulación tetánica produce una elevación de la $[Ca^{2+}]_i$, este aumento es transitorio y solo puede dar cuenta del curso temporal de la PTP (Parducz y col., 1987).

La hipótesis "de moda" para explicar la génesis de LTP ganglionar propone que uno o varios sistemas de señalización intracelular por segundos mensajeros son activados de alguna manera por la estimulación tetánica y producen una modificación persistente en el terminal presináptico, la que resulta en una mayor liberación evocada de ACh (Briggs y col., 1985c, 1988).

La estimulación tetánica de las fibras preganglionares produce un aumento de la síntesis de AMPc y GMPc y de la hidrólisis de fosfolípidos de inositol (Weight y col., 1974; Briggs y col., 1982, 1985b); a su vez, la aplicación de análogos permeables de los nucleótidos cíclicos, de ésteres de forbol o de dadores de óxido nítrico (NO, monóxido de nitrógeno) produce potenciación de la transmisión en el GCS sin necesidad de estimulación preganglionar repetitiva (Briggs y col., 1988, Wu y col., 1991; Bachoo y col., 1992; Briggs, 1992).

La aplicación de H7, un inhibidor poco selectivo de la proteína quinasa C, inhibe parcialmente la inducción de LTP por estimulación preganglionar a alta frecuencia (Bachoo y col., 1992). No se ha reportado al presente el efecto de inhibidores específicos de ésta u otras quinasas (como las dependientes de AMPc y GMPc) sobre la inducción de LTP en el GCS.

Como en el GCS se detectan altos niveles de actividad de la enzima sintetasa de NO (Dun y col., 1993; Sheng y col., 1993), y en particular en las fibras preganglionares, se ha postulado que el NO pueda actuar como mediador en la potenciación ganglionar activando a la guanilato ciclasa y la síntesis de GMPc (Briggs, 1992). Los inhibidores de la sintetasa de NO bloquean el aumento de GMPc producido por estimulación tetánica (Sheng y col., 1992) pero hasta el momento no se ha reportado el efecto de estas drogas sobre la inducción de potenciación.

Un aspecto inexplorado de la potenciación de la transmisión nicotínica ganglionar, es la posibilidad de que su inducción y/o mantenimiento esté modulados en forma heteróloga por alguno de los posibles neurotransmisores/neuromoduladores locales que existen en el GCS.

Uno de los objetivos del presente trabajo es examinar el posible rol del GABA desde este punto de vista.

Modulación de la transmisión en el ganglio cervical superior: neuromoduladores no colinérgicos.

Desde hace tiempo se conoce la presencia en el GCS de neuronas pequeñas, diferentes de las células principales postganglionares (Williams, 1967, 1969). Las prolongaciones de estas células son locales al ganglio y algunos estudios describen un circuito en el que estas neuronas reciben inervación preganglionar y a su vez hacen sinapsis sobre las neuronas postganglionares. Por estas características fueron consideradas como neuronas intercalares o interneuronas (Williams, 1967). Estas células fueron identificadas con las células SIF (Small Intensely Fluorescent) pequeñas células tipo cromafines que fluorescen cuando el tejido es preparado con una técnica histoquímica que revela catecolaminas. La síntesis entre la supuesta interneurona y la célula SIF fue hecha por B. Libet en la década del 70, quien propuso que interneuronas SIF dopaminérgicas, tras ser activadas (via receptores muscarínicos) por la ACh preganglionar, liberan dopamina (DA) la cual genera el PPSI lento en la neurona postganglionar (Figura 7) (Libet, 1986, 1992).

La hipótesis de la interneurona SIF (Dun y Karczmar, 1978) está actualmente cuestionada (Smith, 1993, 1994) principalmente a partir de la demostración de que el PPSI lento se debe probablemente a la activación directa por ACh de receptores muscarínicos situados en la membrana de la neurona postganglionar, en vez de a un proceso disináptico que involucre la liberación Ca^{2+} -dependiente de DA (Cole y Shinnick-Gallagher, 1984).

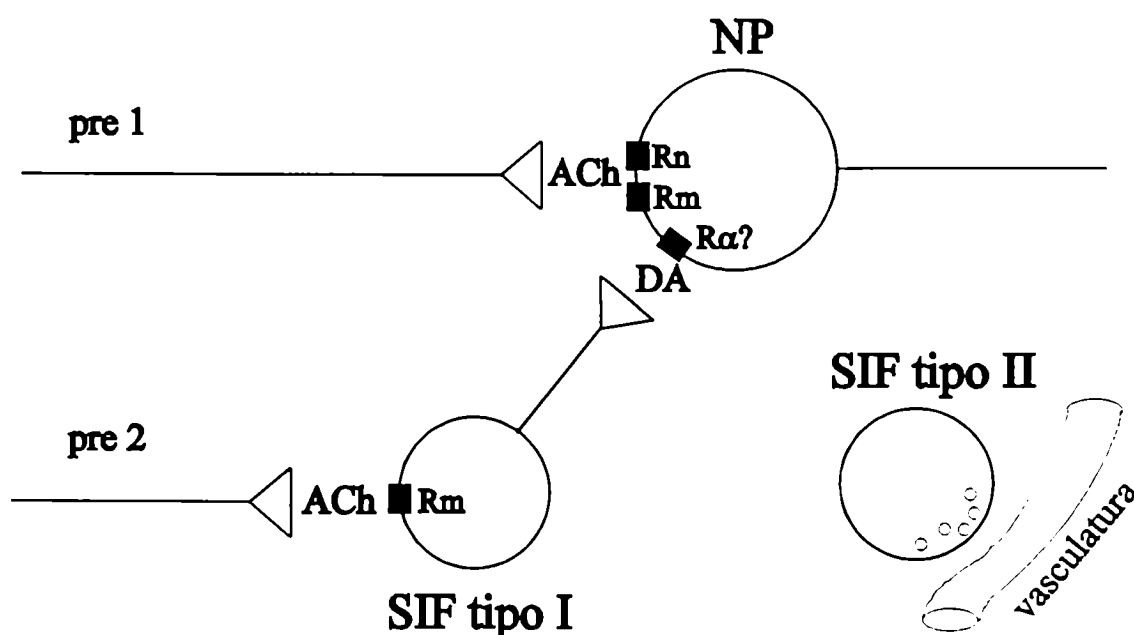


Figura 7. Posibles funciones de las células SIF en el GCS. De acuerdo a este modelo las SIF tipo I son interneuronas que tras la estimulación de receptores muscarínicos (Rm) por la ACh preganglionar (pre2) liberan dopamina (DA). La DA actuando sobre receptores no bien identificados (posiblemente α -adrenérgicos, $R\alpha$) genera un potencial sináptico lento en la neurona postganglionar (NP). Una hipótesis alternativa sugiere que el potencial sináptico lento se origina por activación directa de Rm en la NP (via pre1). Las SIF tipo II, que se hallan en relación estrecha con los capilares ganglionares, posiblemente sean células neurosecretoras. Rn: receptor nicotínico.

Un problema adicional está en la identidad del receptor que media el supuesto efecto de la DA, ya que la respuesta no se bloquea con antagonistas de receptores para DA y parece antagonizarse por bloqueantes α -adrenérgicos (Libet, 1992), aunque esto último también ha sido discutido (Cole y Shinnick-Gallagher, 1984). Dado que un número considerable de evidencias experimentales son compatibles con la hipótesis de la interneurona SIF, ésta aún sigue siendo considerada (Libet, 1992).

Las células SIF constituyen en realidad una población heterogénea (Figura 7), en primer lugar se han descrito al menos dos tipos: SIF tipo I con las características de interneurona mencionadas anteriormente y SIF tipo II, las que se agrupan específicamente alrededor de los capilares sanguíneos del ganglio y son consideradas como células neuroendocrinas o neurosecretoras (Elfvín y col., 1993).

Por otra parte el estudio citoquímico más detallado reveló que distintos subtipos de SIF, morfológicamente equivalentes, sintetizan y almacenan diversas sustancias que en el sistema nervioso median la comunicación intercelular; además de DA (Sakai y col., 1989) se han detectado en estas células: adrenalina y/o noradrenalina (Elfvín y col., 1975 citado en Elfvín y col., 1993), serotonina (Verhofstad y col., 1981; Kanagawa y col., 1986; Happolla, 1988) e histamina (Happolla y col., 1985). También se han detectado en células SIF distintos péptidos tales como: metionina- y leucina-encefalinas, sustancia P, neuropéptido Y, CGRP (péptido relacionado con el gen de la calcitonina), dinorfina, neo-endorfina, neurotensina (Elfvín y col., 1993).

Independientemente de que desde este punto de vista haya cierta variación entre especies, los datos enumerados sugieren la posibilidad de que exista una variedad de acciones modulatorias sobre la transmisión ganglionar por sustancias liberadas desde las células SIF.

Además de las células SIF, las neuronas postganglionares en sí mismas pueden ser también fuente de posibles neuromoduladores, si bien estas células liberan su transmisor (noradrenalina, NA) principalmente en los terminales sinápticos de la unión neuroefectora fuera del ganglio, se ha postulado que existe liberación dendrítica de NA (Martínez y col., 1980). Por otra parte en el soma de las neuronas ganglionares se detectan numerosos péptidos que podrían liberarse localmente e influir sobre la transmisión ganglionar, entre ellos: neuropéptido Y, galanina, dinorfina, péptido YY, somatostatina, sustancia P, VIP (péptido intestinal vasoactivo), encefalinas, CGRP (Kessler y Black, 1982; Janig y McLachlan, 1992a; Luebke y col., 1992; Elfvín y col., 1993).

Para muchas de las sustancias mencionadas hasta aquí se ha descrito en el GCS la presencia de sitios receptores y de efectos significativos asociados a la activación de los mismos (Elfvín y col., 1993). Por motivos de espacio y tiempo no nos extenderemos en detalle, refiriendo al lector a distintos artículos que describen algunos de estos fenómenos (Kafka y Thoa, 1979; Araujo y Collier, 1986; Christian y col., 1989; Field y Newberry, 1991; Zhang y col., 1991; Christian y Weinreich, 1992; Elfvín y col., 1993; Zhang y col., 1993a,b; Alkadhi y col., 1994; Takenaka y col. 1994).

Aunque no lo hemos mencionado hasta ahora, en el GCS se detecta la presencia del ácido γ -aminobutírico (GABA), uno de los transmisores más importantes en el SNC. La posibilidad de que el GABA juegue algún rol en el sistema nervioso periférico y en particular en el GCS constituye la esencia del presente trabajo de Tesis.

Rol del GABA en el ganglio cervical superior: evidencias previas.

El ácido γ -aminobutírico es el neurotransmisor inhibitorio principal en el SNC y en particular en la corteza cerebral, donde su función es bien conocida y ampliamente estudiada. La detección de este aminoácido en tejidos periféricos neurales y no neurales llevó a postular que pudiese actuar como mensajero intercelular fuera del cerebro (Erdo, 1985; Erdo y Wolff, 1990). Ya mencionamos que evaluar esta hipótesis para el caso del GCS es el objetivo de este trabajo de Tesis. En esta sección en primer lugar revisaremos brevemente las bases de la transmisión GABAérgica central y luego examinaremos los antecedentes que existen respecto de la presencia y/o función de este transmisor en el GCS.

En la Figura 8 se esquematizan las etapas y procesos de la transmisión GABAérgica. El GABA se sintetiza por descarboxilación del glutamato en una reacción catalizada por la enzima glutamato descarboxilasa (GAD) (Martin, 1993; Martin y Rimvall, 1993). Parte del transmisor se almacena en vesículas (Kelly, 1993) desde donde se libera por exocitosis Ca^{2+} -dependiente tras la apertura de canales de Ca^{2+} voltaje-dependientes activados por la despolarización del terminal.

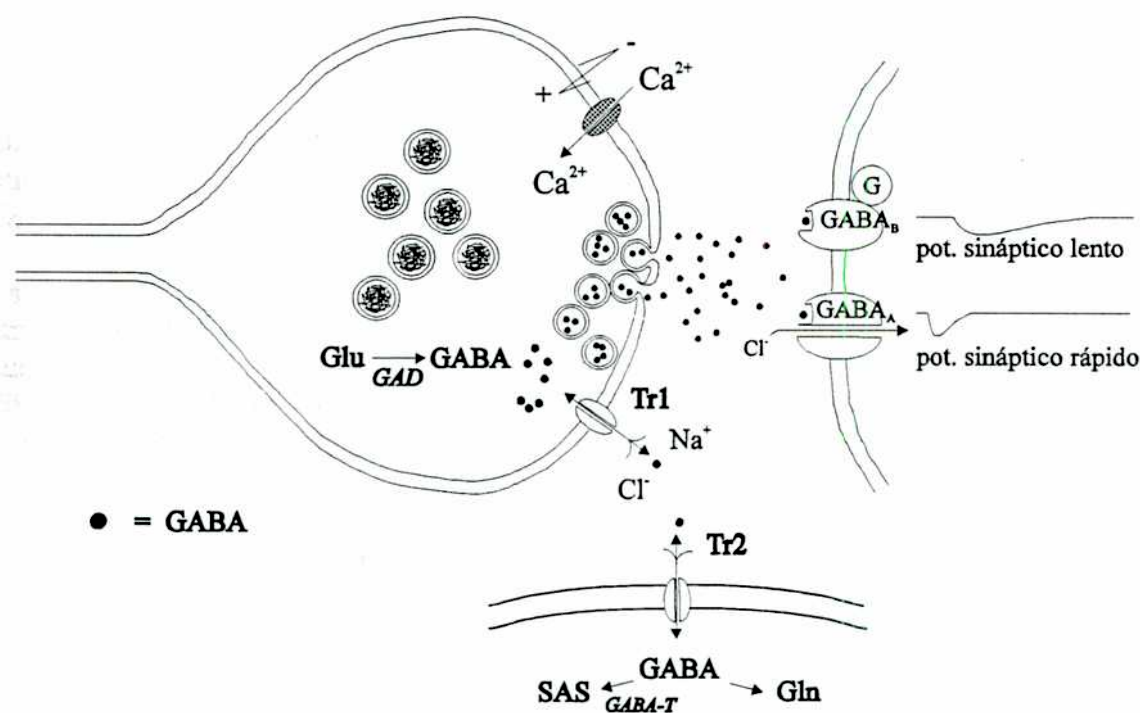


Figura 8. Etapas principales de la transmisión GABAérgica central. GABA se sintetiza a partir de glutamato (Glu) en el citoplasma del terminal por medio de la glutamato descarboxilasa (GAD) y puede almacenarse en vesículas para ser liberado por el mecanismo Ca^{2+} -dependiente o liberarse desde el citosol por el mecanismo Ca^{2+} -independiente mediado por transportador (Tr1). En la postsinapsis pueden activarse receptores GABA_A o GABA_B ; también se encuentran autorreceptores presinápticos, que no se muestran en la Figura. Tras captarse por transportadores extrasinápticos (Tr2) por ejemplo gliales, el GABA puede ser metabolizado a semialdehído succínico (SAS) que entra al ciclo de Krebs, o a glutamina (Gln) que puede reconvertirse en GABA ó Glu. GABA-T: GABA transaminasa.

El transmisor liberado interactúa con receptores:

1) Post-sinápticos: los que en gran parte de los casos son tipo GABA_A, y su activación gatilla la apertura del canal de Cl⁻ que forman las subunidades polipeptídicas de este receptor ionotrópico (Macdonald y Olsen, 1994; Bormann, 1988); en otros casos son tipo GABA_B, y vía proteína G activan canales de K⁺ (Bormann, 1988). La activación de estos dos tipos de receptores genera, respectivamente, potenciales sinápticos inhibitorios rápidos y lentos, los cuales a veces pueden coexistir en una misma célula (Mody y col., 1994).

2) Presinápticos: usualmente tipo GABA_B, que actúan por apertura de canales de K⁺ o cierre de canales de Ca²⁺ (Bormann, 1988; Mody y col., 1994); la activación de estos receptores limita la despolarización del terminal y/o el influjo de Ca²⁺, y por lo tanto la liberación de GABA (Mody y col., 1994).

La remoción del transmisor del espacio sináptico se realiza por transportadores ubicados tanto en el terminal presináptico como en células gliales adyacentes (Figura 8) o inclusive en la postsinapsis (Fonnum, 1985; Nicholls y Attwell, 1990). El GABA recaptado por los terminales es en gran parte reutilizado como transmisor, de manera que sólo una pequeña fracción del GABA liberado debe ser repuesto por la GAD (Martin, 1993). Se ha propuesto (Fonnum, 1985) que una vez captado por compartimientos diferentes al terminal, el GABA puede ser transaminado por la enzima GABA-transaminasa (GABA-T) y transformado en glutamina por la glutamina sintetasa. La glutamina puede difundir libremente entre células y ser captada para servir como precursor en la síntesis de GABA y glutamato (Fonnum, 1985; Nicholls y Attwell, 1990).

Recientemente se ha despertado particular atención acerca de las características y funciones de los transportadores de GABA (así como de otros neurotransmisores), en parte como consecuencia del avance en el estudio que se produjo a partir del clonado de sus ARN mensajeros y genes (Bowery, 1990). Numerosos artículos en las principales publicaciones de revisión en neurociencias se han dedicado a este tópico en los últimos años (Amara, 1993a,b; Attwell y col., 1993; Levi y Raiteri, 1993; Lester, 1994). La caracterización del transporte de GABA en el GCS es el objetivo de una parte de esta Tesis.

En particular, una idea que emergió del avance en el estudio de los transportadores de GABA, es la posibilidad de que éstos medien un mecanismo de liberación Ca²⁺-independiente, posiblemente a partir de un "pool" no vesicular del transmisor (Schwartz, 1987; Adam Vizi, 1992; Attwell y col., 1993; Cammack y Schwartz, 1993, Cammack y col., 1994; Corey y col., 1994). Al inicio considerada como un artefacto de ciertas técnicas (Nicholls, 1989; Adam-Vizi, 1992; Bernath, 1992), la liberación de GABA Ca²⁺-independiente, mediada por transportador es actualmente vista como un mecanismo alternativo que en determinadas condiciones puede contribuir a la acción del GABA en distintos circuitos en el sistema nervioso (Attwell y col., 1993; Isaacson y col., 1993; Levy y Raiteri, 1993). Este concepto relativamente nuevo ha sido incluido en el esquema de la Figura 8, que intenta resumir los eventos y mecanismos que participan en la transmisión GABAérgica al menos en el SNC.

La presencia del GABA en el GCS y otros ganglios del sistema simpático fue detectada tiempo atrás (Bertilsson y col., 1976; Waniewski y Suria, 1977). El contenido de GABA referido al peso de tejido o a proteínas totales es significativamente menor en el GCS que en el tejido de corteza cerebral, hecho posiblemente debido a la gran densidad de células y sinapsis GABAérgicas que existe en ésta última (Mody y col., 1994). Se han demostrado cambios en el

contenido de GABA de GCSs sometidos a distintos tratamientos experimentales (como estimulación repetitiva, administración de anestésicos o de bloqueantes ganglionares, Bertilsson y col., 1976) pero dado que el GABA participa en el metabolismo energético celular su presencia o los cambios en su contenido en un tejido no son indicativos de un rol como neurotransmisor (Martin, 1993; Martin y Rimvall, 1993).

En la década del 70 se publicaron varios estudios bioquímicos en los que se examinaron algunos parámetros relacionados a la presencia y efectos del GABA en el GCS, a saber: la presencia (con resultados dispares) de actividad enzimática glutámico descarboxilasa (Nagata y col., 1966; Kanazawa y col., 1976; Erdo y Kiss, 1986) y la capacidad del GCS de captar y liberar ^3H -GABA al medio de perfusión (Bowery y Brown, 1972; Bowery y col., 1979a,b). Experimentos autorradiográficos indicaron que la mayor parte del ^3H -GABA captado por el GCS in vitro era acumulado y liberado por células de la glía (Young y col., 1973), aunque según las condiciones de preparación del tejido (Young y col., 1973; Happolla y col., 1987), el aminoácido tritiado puede acumularse en células con morfología neuronal. Experimentos neuroquímicos sugirieron que el GABA podría actuar sobre la presinapsis inhibiendo la liberación de ACh (Brown y Higgins, 1979).

También durante esa década se publicaron varios estudios electrofisiológicos en los cuales se describe una acción despolarizante del GABA exógeno aplicado in vivo (De Groat, 1970) o in vitro (Bowery y Brown, 1974). En estos trabajos se colocan dos electrodos extracelulares (uno sobre el cuerpo del ganglio y otro sobre el tronco nervioso postganglionar) y la aplicación de GABA, en ausencia de estimulación eléctrica de ningún tipo, desarrolla una despolarización presumiblemente debida a una acción sobre el soma de las neuronas postganglionares, ya que persiste en GCS con sección crónica del nervio preganglionar (Bowery y Brown, 1974).

A pesar de que se había descrito la existencia de sitios de binding para GABA en el GCS (Bowery y col., 1979) y de que la caracterización farmacológica de la respuesta despolarizante indicaba que estaba mediada por receptores similares a los del SNC (en aquel momento solo se conocían los hoy llamados receptores GABA_A) (De Groat y col., 1970; Bowery y Brown, 1974; Bowery y Dray, 1978; Brown y Constanti, 1978; Schlosser y Franco, 1979); en la mayoría de dichos trabajos no se consideró la posible función de esta respuesta al GABA debido principalmente a la falta de evidencias de que el transmisor pudiese sintetizarse y almacenarse, en el GCS, en un compartimiento neuronal.

El uso de metodologías de inmunohistoquímica con anticuerpos anti-GABA, anti-GAD o anti-GABA-T, ha permitido confirmar o predecir la presencia de neuronas GABAérgicas funcionales en diversas áreas del sistema nervioso tales como el neocórtex, el hipocampo y el cerebelo (Somogyi, 1985; Buhl y col., 1994). Experimentos realizados utilizando estas técnicas, permitieron realizar este tipo de análisis en el GCS de rata y aportaron una serie de evidencias que resumiremos a continuación.

El análisis por microscopía óptica muestra la presencia de células multipolares GABA-inmunoreactivas cuyas prolongaciones celulares inmunopositivas terminan dentro del ganglio (Wolff y col., 1986); en contraste no se observa reactividad en las células de la glía (Wolff y col., 1986). Cierta número de las fibras GABA-positivas que se detectan en el GCS ingresan a él desde el tronco nervioso preganglionar (Dobo y col., 1988), sólo una parte de estas fibras

desaparece en ganglios con deservación preganglionar crónica (Dobo y col., 1988), indicando que se originan en cuerpos neuronales situados tanto dentro como fuera del GCS.

En este sentido, al ampliar el estudio a los otros ganglios simpáticos de la región cervical, se observó que en cada uno de ellos hay neuronas GABA-positivas, en número creciente hacia el GCS (Wolff y col., 1993). Las células de ganglios inferiores emiten prolongaciones que ascienden por el tronco simpático cervical para terminar en el GCS. Además en cada ganglio hay neuronas GABAérgicas locales, la mayor densidad de éstas últimas se observa en el GCS (Wolff y col., 1993).

Los axones GABAérgicos terminan en las cercanías de las neuronas postganglionares algunas de las cuales reciben un gran densidad de terminales GABA-positivos (células Ricamente Inervadas por GABA, RIG; Kasa y col., 1988; Wolff y col., 1991). El análisis por microscopía electrónica revela la presencia de terminales axónicos que se marcan para GABA, muchos de los cuales contienen vesículas sinápticas (Dobo y col., 1990; Parducz y col., 1992). Es interesante notar que en estos estudios se detectan muchas terminaciones nerviosas que se tiñen intensamente con el anticuerpo anti-GABA pero en las que no se pueden visualizar vesículas (Parducz y col., 1992). Terminales axónicos de ambos tipos (con o sin vesículas) establecen contactos sinápticos presumiblemente con dendritas de las neuronas postganglionares. Estas sinapsis presentan evidentes densidades postsinápticas, por lo que fueron clasificadas como de tipo I de Gray o asimétricas (Parducz y col., 1992).

Gran parte, aunque no todos, de los resultados obtenidos con antisueros anti-GABA se verificaron al usar inmunohistoquímica para GAD usando antisueros policlonales que reconocen a las isoformas de la enzima que se expresan en el SNC (Kenny y Ariano, 1986; Happolla y col., 1987; Dobo y col., 1990). Las diferencias encontradas entre el uso de ambos tipos de anticuerpos radican fundamentalmente en que el anti-GAD marca en ocasiones algunas células postganglionares, aunque posiblemente se trate de neuronas RIG que en si mismas son GABA-negativas (Dobo y col., 1990). Se ha propuesto que las neuronas locales que se tiñen para GAD en el GCS son una subpoblación GABAérgica de células SIF (Happolla y col., 1987; Dobo y col., 1990; Elfvin y col., 1993).

OBJETIVOS

La serie de trabajos que constituyen el presente trabajo de Tesis persigue, desde un punto de vista neurofarmacológico, el objetivo de extender y obtener nueva información acerca de la posible función del ácido γ -aminobutírico en el sistema nervioso periférico, en particular en el ganglio cervical superior del sistema nervioso simpático.

Los principales objetivos de los experimentos que se presentarán son:

- 1) Estudiar los mecanismos de transporte de GABA
- 2) Estudiar los mecanismos de liberación de GABA inducida por despolarización.
- 3) Estudiar el efecto del GABA sobre la transmisión ganglionar
- 4) Estudiar el efecto del GABA sobre la potenciación actividad-dependiente de la transmisión ganglionar
- 5) Analizar la participación del GABA en la expresión de fenómenos circadianos en el GCS.

MATERIALES Y METODOS

Animales y tejidos de experimentación

Se utilizaron ratas adultas (60 - 90 días, 150 - 250 g) de la cepa Wistar mantenidas (a menos que se indique lo contrario) en un ciclo de 12 hs. de luz : 12 hs. de oscuridad, con apagado de las luces a las 18:00 hs. La temperatura del ambiente fue controlada a $22 \pm 2^\circ \text{C}$ y los animales tuvieron acceso libre a agua y alimento balanceado tipo Purina.

Los animales se sacrificaron por decapitación y el ganglio cervical superior (GCS) fue disecado junto con los troncos nerviosos pre- y postganglionares y fragmentos de tejido adiposo circundante, de arteria carótida y la cápsula de tejido conectivo que lo recubre. El tejido fue colocado rápidamente en una placa de Petri con solución Locke ó HEPES y bajo lupa de disección (10 X) se removió el tejido no neural incluyendo la cápsula conectiva.

Cuando se sacrificó a los animales en distintos horarios del ciclo luz-oscuridad, los mismos fueron decapitados a cada horario informado $\pm 10\text{min}$. En los horarios comprendidos en la fase de oscuridad, el sacrificio se realizó bajo luz roja tenue.

Procedimientos quirúrgicos: desnervación preganglionar

Bajo anestesia por éter etílico se practicó una incisión en la zona del cuello y se separaron las glándulas salivales submandibulares. Seguidamente se expuso el músculo hioideo y se lo divulsionó hasta visualizar el GCS y el tronco simpático cervical (TSC), que se encuentra en aposición con la arteria carótida principal. Se seccionó el TSC y se separó el segmento proximal (Figura 9A) para disminuir la probabilidad de que ocurra re-inervación. El ganglio contralateral del mismo animal fue sometido a una operación simulada en la cual el TSC fue expuesto de la misma manera pero una vez visualizado, se lo dejó intacto; por último se suturó la herida con agrafes de acero inoxidable. Inmediatamente después de recuperarse de la anestesia, los animales exhibieron caída del párpado en el lado ipsilateral a la operación (Figura 9B) la cual fue irreversible hasta el momento de la realización de los experimentos (10 a 15 días post-cirugía), en caso contrario los animales fueron descartados. La sección del nervio preganglionar fue también verificada *in situ* durante la disección del ganglio.

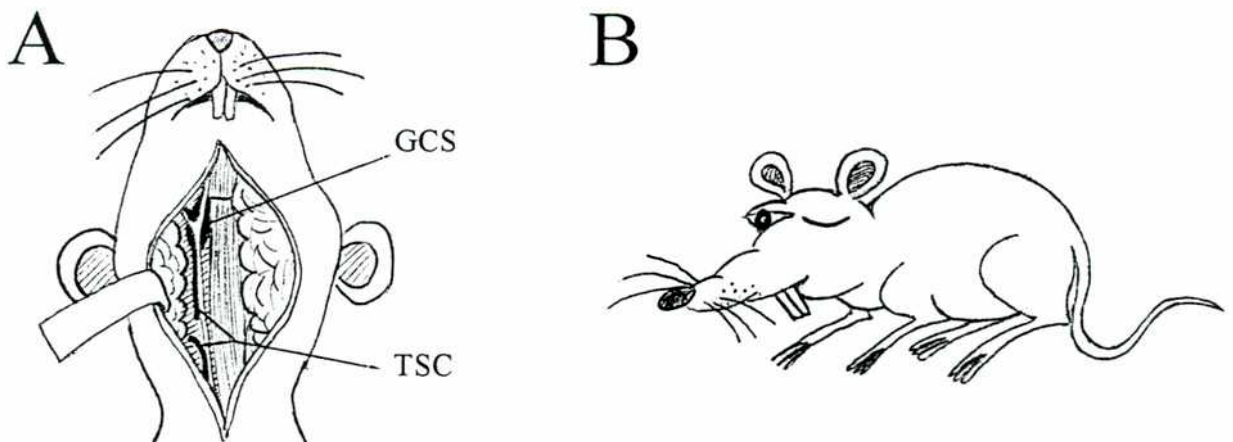


Figura 9. (A) Esquema que muestra el procedimiento quirúrgico de la desnervación preganglionar o descentralización. TSC: tronco simpático cervical, figura modificada de Voyvodic, 1989. (B) Los animales en los que la operación se realizó correctamente exhibieron caída irreversible del párpado ipsilateral a la operación.

Captación de ^3H -GABA

Después de un período de estabilización de ~ 15 min en solución HEPES oxigenada a 37 °C, los ganglios fueron incubados en presencia de distintas concentraciones finales (según el experimento) de ^3H -GABA (New England Nuclear, Actividad específica 80 ó 90 Ci/mmol) durante 10 min a 37 °C en un volumen final de 1 ml de solución HEPES. La captación se detuvo filtrando el tejido sobre una malla de Nylon (tamaño de poro 0.25 mm²) y aplicando 6 lavados de 20 ml cada uno con solución HEPES para remover el ^3H -GABA acumulado en el espacio extracelular. Los ganglios se secaron sobre papel de filtro Whatman GF/C y se pesaron, luego de lo cual se digirieron por 60 min a 50 °C en tubos Eppendorf (capacidad 1.5 ml) con 50 µl de hidróxido de hiamina (Protosol, New England Nuclear). Después de agregar a las muestras 50 µl de ácido acético glacial, la radioactividad liberada del tejido por el tratamiento se cuantificó por centelleo en medio líquido agregando a los viales 20 ml de solución de centelleo; la eficiencia de conteo para Tritio fue usualmente de 35-40 %.

La captación específica, estimada como la diferencia entre la captación total y la obtenida en presencia de un exceso (15 mM) de GABA no marcado (Walz, 1985; Borden y col., 1992) representó entre un 80 y un 90 % de la captación total.

En algunos experimentos se estudió el efecto de distintos inhibidores de los transportadores que median la captación de GABA; todos ellos (2,4-diaminobutirato, β-alanina y ácido nipecotico) son solubles en solución acuosa y fueron disueltos directamente en solución HEPES. Para estudiar su efecto, la preparación se incubó en presencia de los inhibidores 10 minutos antes de agregar el GABA tritiado.

Eflujo de ^3H -GABA

Después de un período de estabilización de ~ 15 min a 37 °C en solución HEPES oxigenada, los ganglios se incubaron en presencia de ^3H -GABA (10 µCi / ml) por 30 min a 37 °C. Después de la incubación el tejido se lavó 5 veces con 10 ml de solución HEPES y se colocó en cámaras de perfusión (dos ganglios por cámara) de 300 µl de capacidad conectadas a una bomba peristáltica (Figura 10) mediante tubuladuras de Tygon de 1 mm de diámetro interno. Por medio de esta bomba se perfundió solución HEPES oxigenada y mantenida en un baño a 37 °C a una velocidad de flujo de 0.4 ml / min y el perfusato se colectó durante todo el experimento en fracciones de 2 ml (5 min de perfusión) en viales de 20 ml para la posterior medición de la radioactividad por centelleo líquido (Figura 10).

El análisis del curso temporal del eflujo de tritio medido en estas condiciones mostró que tras colectar las primeras fracciones, el eflujo alcanza un nivel basal estable hacia los 20-40 min de comenzada la perfusión. No antes de 50 min, en cada experimento el medio de perfusión normal se sustituyó por el medio a ser estudiado. Cuando éste último experimental tuvo alta [K⁺] (solución HEPES K⁺ alto) se lo aplicó por 5 min (una fracción), y siempre se disminuyó la [Na⁺] de manera de preservar la osmolaridad de la solución. En algunos experimentos la preparación fue expuesta más de una vez a solución de alta [K⁺], en esos casos las exposiciones sucesivas se separaron por un intervalo de 35 minutos.

Los medios de perfusión con bajo Ca²⁺ usualmente se aplicaron a la preparación 5 min antes y durante la perfusión con alto K⁺, pero en varios casos se aplicaron desde el inicio del experimento o al menos 30 min antes de la exposición a alta [K⁺]; con ambos procedimientos se obtuvieron resultados equivalentes. Cuando se restituyó el medio con

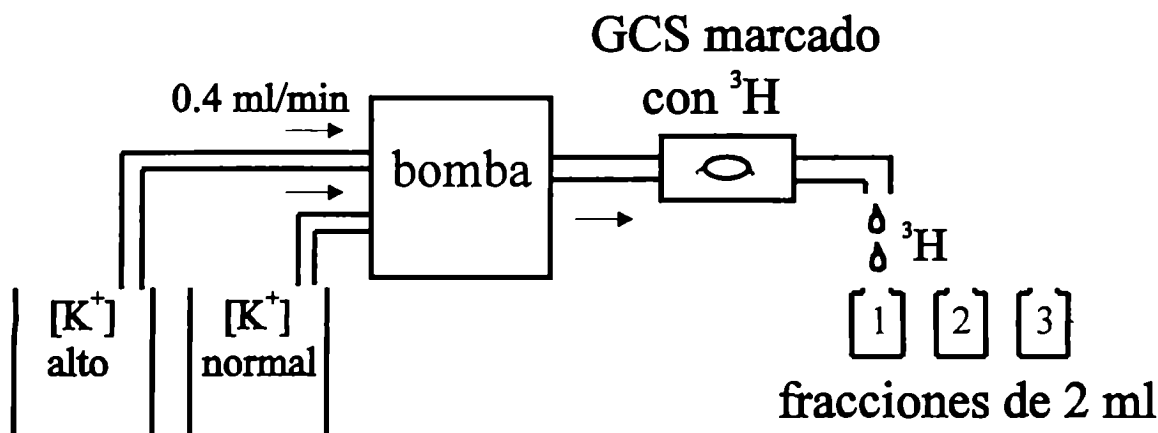


Figura 10. Esquema que representa el sistema experimental utilizado para los experimentos donde se estudió el flujo de transmisores tritiados. El medio de superfusión se alternó entre el medio normal y el que contenía K^+ alto y/o la sustancia a testear. A un flujo de 0.4 ml/min el superfusato se recogió en fracciones de 2 ml (5 min c/u) en viales de vidrio en los cuales posteriormente se determinó la radioactividad por centelleo líquido.

$[Ca^{2+}]_e$ normal tras la exposición prolongada a condiciones de Ca^{2+} bajo, se obtuvieron respuestas normales a la elevación de la $[K^+]_e$ indicando que al menos desde el punto de vista de este parámetro, la viabilidad de la preparación se preservó intacta (Junge, 1992b).

Al final de la perfusión, para determinar la cantidad de GABA tritiado remanente en el tejido, el mismo se digirió con hidróxido de hiamina y se midió la radioactividad por centelleo líquido en la forma usual. Con este dato, el ^3H liberado en cada fracción se normalizó como el porcentaje del ^3H contenido por el tejido al momento de coleccionar la muestra (Walz, 1985). Ninguno de los tratamientos empleados durante este trabajo produjo una disminución significativa del flujo basal de ^3H -GABA. Los aumentos evocados del flujo (eflujo ó liberación suprabasal) fueron cuantificados restándole a cada fracción que exhibiera valores por sobre la línea de base, el promedio (B) de los tres valores basales previos y posteriores a la estimulación (Figura 11).

Influjo de $^{36}\text{Cl}^-$

El efecto del GABA sobre la captación de cloruro radioactivo se midió en células totales de GCS disociadas según un método descrito para registrar en estas células corrientes de cloruro activadas por GABA (Cull-Candy y col., 1986; Newland y col., 1991). Brevemente, GCS obtenidos de ratas de 20 días (P20) fueron desprovistos de su cubierta de tejido conectivo y tras seccionar los troncos nerviosos al ras del cuerpo del ganglio, el tejido se fragmentó en pedazos pequeños y se lo incubó por 20 min a $37 \text{ }^\circ\text{C}$ con agitación en 5 ml de medio de cultivo (M199, Sigma Chemical Co.) "buffereado" con HEPES y conteniendo 140 U/ml de colagenasa (Worthington Biochemical Corporation, $138 \text{ U/mg cls } 1$), 0.5 mg / ml de Tripsina 0.25% (GIBCO BRL), 6 mg / ml de albúmina de suero bovino (Sigma) y $3 \text{ } \mu\text{g / ml}$ de DNAsa I (tipo IV, Sigma Chemical Co.). Los fragmentos de tejido visibles se disociaron mecánicamente con una pipeta Pasteur y la suspensión se centrifugó por 5 min a 500 g . El pellet se lavó una vez en medio libre de enzimas y la suspensión se dejó estabilizar 30 min en medio de cultivo oxigenado.

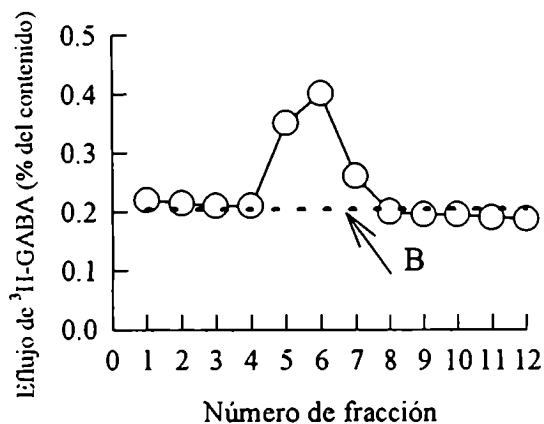


Figura 11. El eflujo basal se calculó promediando el valor de tres fracciones antes y después de la estimulación (fracciones 2,3,4,8,9 y 10). El valor promedio se muestra con la línea de puntos B. El eflujo suprabasal se obtuvo restando B a 5, 6 y 7.

Después de centrifugar 5 min a 500 g, el pellet se resuspendió en solución HEPES y se cuantificó el % de células viables con Azul Tripán. Se agregaron $0.75 - 1 \times 10^6$ células por tubo y la reacción de captación se inició agregando solución HEPES conteniendo $^{36}\text{Cl}^-$ (New England Nuclear, Act. Esp. 14.3 mCi/g, 0.25 $\mu\text{Ci}/\text{tubo}$) con o sin GABA (concentración final 100 μM) y se detuvo 5 seg después agregando 10 ml de solución HEPES libre de $^{36}\text{Cl}^-$ equilibrada en hielo y filtrando las células sobre papel Whatman GF/C embebido en polietilenimina 0.05%. Debido a la gran variabilidad interensayo, los resultados se expresaron como % de la captación basal observada en ausencia de GABA. Se determinó la cantidad de $^{36}\text{Cl}^-$ retenida por los filtros en ausencia de células y ésta fue sustraída de todos los valores.

En experimentos realizados en paralelo se estudió el efecto del GABA sobre la captación de $^{36}\text{Cl}^-$ por sinaptoneurosomas de corteza cerebral de hamster siguiendo una metodología standard usada en el laboratorio (Harris y Allan, 1985).

Eflujo de ^3H -acetilcolina.

Los ganglios obtenidos en la manera ya descrita, se incubaron 5 min en un solución HEPES oxigenada de $[\text{K}^+] = 40 \text{ mM}$, este procedimiento facilita la marcación posterior del pool liberable de Acetilcolina (ACh). Luego de lavar con solución HEPES normal, el GCS se incubó 30 min en presencia de ^3H -colina (Act. Esp. 60-80 Ci/mmol, 5-10 $\mu\text{Ci}/\text{ml}$). El tejido se lavó 5 veces con solución HEPES libre de ^3H y se transfirió a cámaras de perfusión de 300 μl de capacidad (dos ganglios por cámara) conectadas a una bomba de perfusión a través de tubuladuras de Tygon (Figura 10). La metodología utilizada en el resto del experimento es básicamente igual a la empleada para estudiar el eflujo de ^3H -GABA, excepto que se agregó eserina (3 μM , concentración final) al medio de perfusión.

Captación de ^3H -colina

El transporte de colina tritiada se estudió en GCS obtenidos en la manera usual. Después de un período de estabilización en solución HEPES, el tejido se preincubó 10 min en solución de $[\text{K}^+] 40 \text{ mM}$. Este procedimiento fue necesario para poder observar captación de colina sensible a Hemicolinio-3 (HC-3), un inhibidor selectivo de los transportadores neuronales de colina (Kuhar y Murrin, 1978; Tucek, 1985). Tras lavarlo, el tejido se incubó

por 10 min con ^3H -colina (Act. Esp. 80 Ci/mmol, 2 $\mu\text{Ci/ml}$, concentración final 25 nM). Sin la preincubación con alto K^+ , la captación de ^3H -colina fue completamente insensible al HC-3. La captación específica se definió como la diferencia entre la total y la observada en presencia de HC-3 20 μM agregado 20 min antes que la colina marcada y tras la preincubación con alto K^+ . Por lo usual, la captación específica representó un 40-50 % de la total. El procedimiento restante fue básicamente idéntico al descrito para la captación de ^3H -GABA.

Síntesis de ^3H -acetilcolina

La síntesis de ACh se determinó a través de la conversión de ^3H -colina en ^3H -ACh según a un método ya descrito (Rand y Johnson, 1981). Brevemente, los ganglios se homogeneizaron en 100 μl de buffer de homogeneización (Tricina 10 mM, tioglicolato de Na^+ 10 mM, EDTA 1 mM, fenantrolina 1 mM, pH 8.0) a 0-4 $^\circ\text{C}$. Se mezclaron en viales de vidrio (5 ml de capacidad) 50 μl de homogenato (conteniendo 100-150 μg de proteínas determinadas por el método de Lowry) con 50 μl de buffer de ensayo (Tricina 50 mM, acetil-Coenzima A 500 μM , eserina 20 μM , pH 8.0) conteniendo 0.2 μCi de ^3H -colina, concentración final 24 nM. La mezcla se incubó por 10 min a 37 $^\circ\text{C}$ con agitación tras lo cual se agregaron 100 μl de solución de colina quinasa (Tris-HCl 10 mM, Cl_2Mg 20 mM, ATP 10 mM, 0.2 U/ml de colina quinasa de levaduras, pH 8.1); después de agitar generosamente la incubación se prosiguió por 30 min a 37 $^\circ\text{C}$ y la reacción se detuvo agregando 200 μl de agua destilada a 0 $^\circ\text{C}$ seguida por 4 ml de solución de centelleo con tetrafenilbora (PPO 0.5 %, POPOP 0.03 %, alcohol isoamílico 10 %, tetrafenilborato de sodio 0.3 %). Después de agitarlos hasta obtener una emulsión los viales se dejaron en reposo al menos 30 min tiempo al cual se observó una clara separación de fases, y se midió la radioactividad en un contador de centelleo líquido.

La ^3H -colina que no reacciona en la primera incubación se transforma (por la acción de la colina quinasa) en ^3H -fosforilcolina, compuesto que permanece en la fase acuosa. En presencia de tetrafenilbora, la ^3H -ACh formada se extrae a la fase orgánica del líquido de centelleo a base de tolueno. Los blancos de la reacción se obtuvieron incubando homogenatos previamente hervidos 10 min a 100 $^\circ\text{C}$.

Descarboxilación de ^{14}C -glutamato.

La síntesis de GABA a partir de glutamato se estudió a través de la reacción de descarboxilación de glutamato marcado con ^{14}C en la posición 1, desde donde por acción de la glutamato descarboxilasa es liberado específicamente en forma de ^{14}C - CO_2 . A tal efecto se utilizó una metodología ya descrita (ver citas en Rosenstein y Cardinali, 1990). Brevemente, los ganglios se extrajeron de animales recién sacrificados y tras remover la cápsula de tejido conectivo se homogeneizaron en 200 μl de buffer fosfato de potasio 50 mM, pH 6.8. Cien μl de homogenato se incubaron en tubos Eppendorf (1.5 ml de capacidad) por 60 min a 37 $^\circ\text{C}$ junto con 200 μl de una solución que contenía: 1- ^{14}C -glutamato (1.4 $\mu\text{Ci/ml}$, Act. Esp. 50 Ci/mol), fosfato de piridoxal 200 μM y β -mercaptoetanol 10 mM. La reacción se detuvo agregando ácido tricloroacético (TCA) 10 % y el ^{14}C - CO_2 liberado en los 120 min siguientes se capturó en papeles de filtro embebidos en hidróxido de hiamina, colocados en el extremo superior del tubo Eppendorf. La radioactividad captada por los filtros se determinó por centelleo líquido según lo usual. Los blancos de la reacción se obtuvieron agregando el TCA antes que el homogenato.

Registro electrofisiológico extracelular.

La metodología utilizada en este trabajo permite estudiar la transmisión ganglionar mediante una técnica de registro extracelular. Básicamente consiste en aplicar un estímulo eléctrico de campo a la población de fibras preganglionares y registrar la respuesta originada sinápticamente en la población de axones postganglionares.

Durante la disección bajo lupa se removió el tejido conectivo que recubre al GCS preservando la integridad de los nervios pre y postganglionares los que se seccionaron a 3-6 mm (nervios post-ganglionares carotídeo interno y externo) ó 10-12 mm (tronco simpático cervical preganglionar) de su origen en el cuerpo del ganglio. La preparación se montó en una cámara de registro de paredes y fondo recubiertos con Sylgard y, a través de vías de entrada y salida conectadas por tubuladuras de Tygon a una bomba de perfusión, se recambió la solución Locke oxigenada. Durante la perfusión, el volumen estacionario en la camarita fue de 0.3 ml y a un flujo de 1.5 ml/min el recambio total de la solución se obtuvo en 3-5 minutos.

Para el registro y estimulación, siguiendo un método descrito previamente (Brown y McAfee, 1982), se utilizaron electrodos de succión construidos con alambre de plata clorada y vidrio capilar de borosilicato (Corning 7740, A-M Systems) montados en un porta-electrodos de succión (A-M Systems) mediante el que se aplicó presión negativa bajo control visual, de modo de introducir el extremo del nervio en la pipeta. En distintos experimentos se utilizaron diferentes "configuraciones" de estimulación y registro (Figura 12) pero en la mayoría de los casos se registró la señal eléctrica en el nervio carotídeo interno (NCI, Figura 12A).

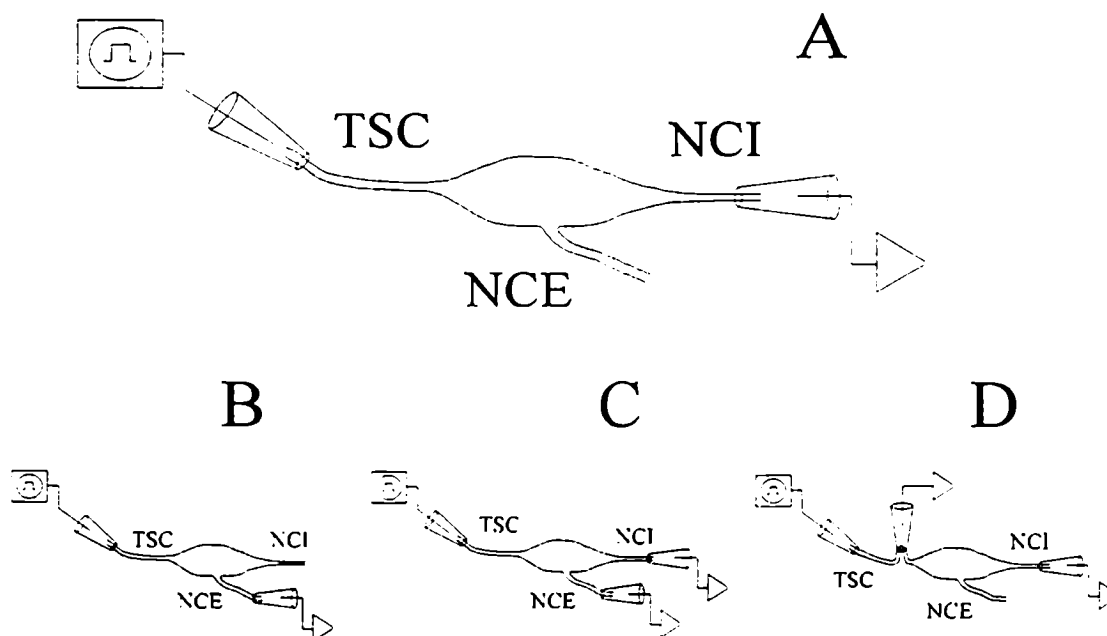


Figura 12. Diferentes configuraciones de estimulación y registro utilizadas en este trabajo. (A) fue la utilizada en la mayor parte de los experimentos. Cuando se comparó la transmisión dirigida a ambos nervios postganglionares se usó (A) seguido por (B) y ocasionalmente (C). La configuración (D) se usó para analizar simultáneamente la actividad pre y postganglionar. Para abreviaturas ver el texto.

El electrodo de estimulación se conectó a un estimulador (Rhema Labortechnik 505115) con el cual se aplicaron pulsos cuadrados de voltaje de 0.5 mseg de duración. La

señal recogida por el electrodo de registro se amplificó y filtró (amplificador diferencial Tektronix Type 3A9; filtro pasa-bajos frecuencia -3 dB = 1 kHz) y se visualizó en un osciloscopio (Tektronix Type 565). Tras pasar por un conversor analógico-digital (Labmaster TL-1 DMA, Axon Instruments Inc., frecuencia de muestreo 12.5 kHz) la señal (digitalizada) se adquirió en una computadora equipada con software adecuado para adquisición y análisis de señales eléctricas (P Clamp 5.1, Axon Instruments Inc.)

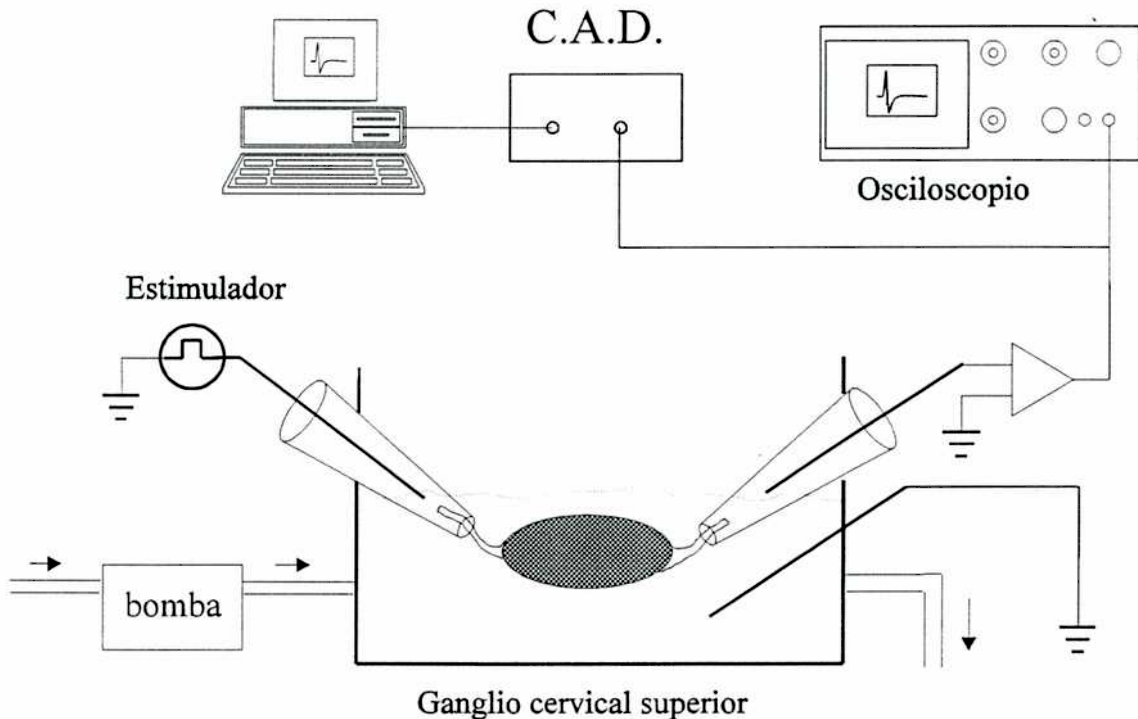


Figura 13. Diagrama del setup experimental utilizado para el registro electrofisiológico de la transmisión ganglionar. C.A.D.: conversor analógico - digital. Para detalles ver el texto.

En muchos casos la señal se almacenó en disco "floppy" para su análisis inmediato en una computadora independiente. La salida analógica del conversor analógico-digital se utilizó para comandar el experimento desde la computadora, sincronizando el estimulador con la adquisición. En la Figura 13 se representa esquemáticamente este "set-up" experimental.

Con esta metodología se registran los potenciales de acción propagados en los axones de las neuronas postganglionares que alcanzan el umbral de disparo tras la estimulación preganglionar. Cada estímulo aplicado a la presinapsis evocó una única respuesta en el nervio postganglionar, la señal registrada con el electrodo extracelular clásicamente (Junge, 1992a) se interpreta como el resultado de la actividad sumada de las fibras que componen el nervio, por lo cual se lo denomina Potencial de Acción Compuesto (PAC). La Figura 14A muestra un registro típico del PAC obtenido en el nervio carotídeo interno (NCI) tras la estimulación del nervio preganglionar. Esta señal desaparece rápidamente en ausencia de Ca^{2+} externo y se bloquea fácilmente por acción de antagonistas de receptores nicotínicos (d-tubocurarina o hexametonio), indicando que se origina por estimulación sináptica de las neuronas postganglionares. Usualmente el PAC del NCI fue bifásico (Fig. 14A) pero en algunos casos solo la fase inicial fue visible. La señal registrada en el nervio carotídeo externo por lo común

Ocasionalmente la señal mostró una deflexión tardía (Figura 14B) que, aunque se considera que esta técnica de registro sólo detecta el potencial de acción propagado, ha sido interpretada por algunos como la señal de campo asociada al potencial postsináptico excitatorio (PPSE) (Blaustein, 1971; Dunant y Dolivo, 1968a); en nuestras condiciones experimentales este componente se observó sólo en algunos pocos registros, por lo cual no fue analizado.

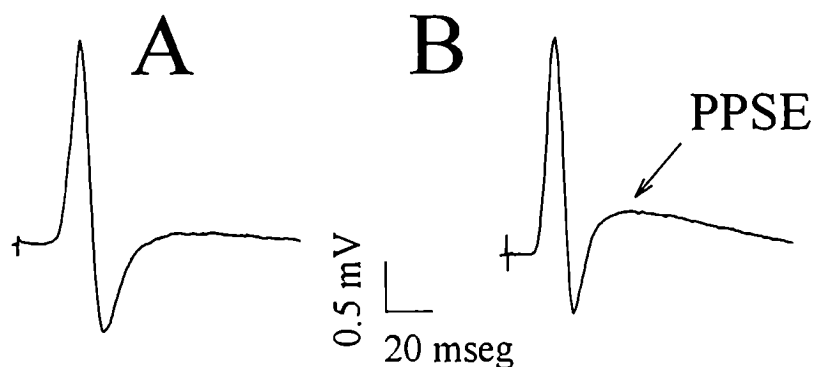


Figura 14. (A) Registro típico del potencial de acción compuesto (PAC) en el evocado en el NCI por la estimulación preganglionar. En la mayoría de los casos la señal fue tipo bifásica como la de la Figura. (B) En ocasiones el PAC mostró una deflexión tardía que ha sido interpretada por algunos como la señal extracelular asociada al potencial postsináptico excitatorio (PPSE).

Dado que es poco sensible a los cambios en la sincronía de disparo (Briggs y col., 1985a; Magee, 1992) el área bajo la curva de la espiga inicial es el parámetro que mejor indica el grado de reclutamiento de axones, es decir la cantidad de células postganglionares que disparan potencial de acción en respuesta al estímulo preganglionar. Sin embargo, la amplitud al pico del PAC es el parámetro usado en la mayoría de los laboratorios (Brown y McAfee, 1982; Briggs y col., 1985a; Alonso deFlorida, 1991; Wu y col., 1990; Scott, 1993) y fue el utilizado en los experimentos aquí descritos. En nuestras condiciones experimentales el área y la amplitud de señales obtenidas en experimentos control, durante la inhibición mediada por GABA o durante la potenciación de la transmisión mostraron una correlación positiva altamente significativa (Figura 15A).

El efecto inhibitorio del GABA se evidenció como una reducción de la amplitud de la señal, pero también como un aumento de la latencia (tiempo entre el artefacto de estimulación y el inicio de la señal) y el tiempo al pico (tiempo entre el artefacto y el punto de máxima amplitud) de la misma. La amplitud fue el parámetro elegido, dado que

fue el mas sensible y el que mostró una mejor dosis-dependencia (ver sección Resultados). La inhibición de la transmisión se cuantificó como:

$$\% \text{ de inhibición} = [1 - (V(\text{droga}) / V_c)] * 100$$

donde: V(droga) es la amplitud de la señal durante el máximo efecto de la droga y Vc es el promedio de amplitud de al menos 10 señales previas.

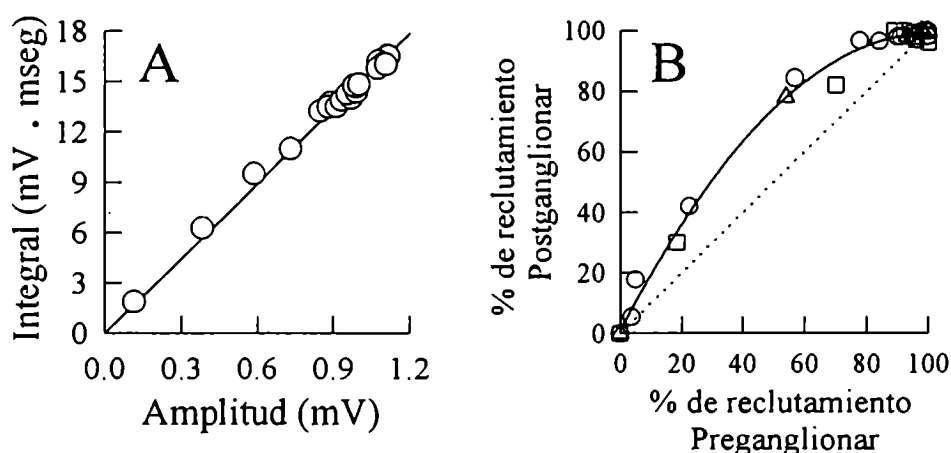


Figura 15. (A) Se grafican la integral y la amplitud de señales obtenidas en el NCI antes y durante el efecto inhibitorio del GABA o la potenciación post-tetánica de la transmisión, se observó una correlación altamente significativa ($r = 0.997$, $p < 0.001$); (B) Se grafica la amplitud de señales registradas simultáneamente en el TSC y el NCI según lo mostrado en Figura 12D, como porcentaje del valor máximo obtenido al aplicar estímulos de intensidad creciente (rango de 0 a 10 V, intervalo 0.5 V) al nervio preganglionar. Cada símbolo corresponde a un ganglio diferente $n = 3$.

Protocolo de inducción de potenciación post-tetánica

Para poder detectar un incremento de la eficacia sináptica, los estímulos pre tetánicos deben evocar una respuesta postsináptica submáxima. En la mayor parte de los estudios reportados de la potenciación sináptica ganglionar (Brown y McAfee, 1982; Briggs y col., 1985a; Wu y col., 1990; Alonso deFlorida 1991; Bachoo y Polosa 1991, 1992a,b; Scott, 1993; Alkhadi y col., 1994) esta condición se obtiene aplicando al nervio preganglionar un estímulo de intensidad supramáxima y produciendo un bloqueo parcial de la transmisión mediante un antagonista nicotínico. De esta manera, se obtiene una respuesta postsináptica submáxima frente a la estimulación preganglionar supramáxima, ésto último permite descartar que la potenciación observada se deba en realidad a un aumento post-tetania del reclutamiento de fibras preganglionares (Briggs y col., 1985a).

Como se mencionó previamente, en el GCS existe un alto grado de convergencia de fibras presinápticas sobre cada neurona postganglionar (Skok 1980; Smith, 1993, 1994) y la estimulación de un número submáximo de ellas es suficiente para que la neurona

postganglionar alcance el umbral de disparo. Haciendo un análisis de población, es posible entonces observar una respuesta máxima en el nervio postganglionar aun con un reclutamiento submáximo de fibras preganglionares. Para determinar qué intensidad de estímulo es necesaria para alcanzar el reclutamiento preganglionar máximo y "cumplir" con el requerimiento planteado en el párrafo anterior, se realizaron registros simultáneos del PAC pre y postganglionar (de acuerdo con lo mostrado en la Figura 12D) y se analizó la amplitud de cada uno frente al aumento del voltaje del estímulo aplicado al nervio preganglionar. En 3 de 3 experimentos el reclutamiento postganglionar tendió a ser mayor que el preganglionar a cada intensidad de estímulo (Figura 15B). El reclutamiento postganglionar máximo se alcanza con un reclutamiento preganglionar submáximo (~ 75 - 80 %). En estos experimentos, con un voltaje de al menos 2 veces el necesario para obtener el 100 % de reclutamiento postganglionar se obtuvo siempre una respuesta preganglionar del 100 %.

En la mayoría de los experimentos donde se estudió la potenciación post-tetánica de la transmisión nicotínica ganglionar, se utilizó entonces la estimulación preganglionar supramáxima (2 veces el voltaje que produce respuesta postganglionar máxima) en presencia del bloqueante nicotínico neuronal hexametonio, en concentración tal (80-200 μM) que reduzca la amplitud de la señal postsináptica hasta un 30-40 % de su valor máximo (Briggs y col., 1985a) para, como se mencionó previamente, obtener una respuesta submáxima susceptible de ser potenciada.

Para estudiar la potenciación de la transmisión nicotínica sin contaminación del efecto de la activación de receptores muscarínicos, que puede desarrollar efectos de largo plazo sobre la transmisión (Mochida y Libet, 1985), se agregó al medio de perfusión atropina (2 μM) según lo descrito previamente (Brown y McAfee, 1982; Briggs y col., 1985a).

En algunos experimentos, la potenciación se visualizó utilizando estimulación preganglionar submáxima y en ausencia de antagonistas colinérgicos, para ello el voltaje del estímulo aplicado al nervio preganglionar se graduó de manera de obtener una amplitud de señal postsináptica de un 30-40 % del valor máximo para, como se mencionó previamente, obtener una respuesta susceptible de ser potenciada. Durante la máxima potenciación obtenida tras la estimulación tetánica, la amplitud de la señal postsináptica alcanza el 100 % original y luego decae hasta el valor pretetánico de acuerdo con lo descrito previamente (Brown y McAfee, 1982).

Tras obtener al menos 30 min de registro estable se aplicó un protocolo de estimulación tetánica para inducir la potenciación de la transmisión. El protocolo más usado aquí consistió en un tren de 20 seg de duración a una frecuencia de 20 Hz (400 pulsos en total) manteniendo constantes el voltaje (ya fuera supramáximo o submáximo) y la duración (500 μseg) de cada estímulo durante todo el experimento. Antes y después de la estimulación tetánica, la frecuencia de estimulación fue de 0.017 Hz (un impulso/60 seg) y fue constante de experimento en experimento, ya que la frecuencia de testeo tiene un fuerte influencia sobre el curso temporal de la potenciación (Briggs y col., 1985a).

Debido a que el valor absoluto de la amplitud de la señal fue extremadamente variable (rango ~ 0.5 a 8 mV), los datos de amplitud se normalizaron según (Brown y McAfee, 1982):

$$P(t) = (V(t) - V_c) / V_c;$$

donde V_c es la amplitud promedio de al menos 10 señales previas a la estimulación tetánica y $V(t)$ es la amplitud de la señal al tiempo t post-tetania; $P(t)$ es una variable sin dimensión que representa la potenciación como fracción del valor previo (Brown y McAfee, 1982). En algunos experimentos donde se observó una suave caída (lineal) de la transmisión basal, el decaimiento fue corregido de acuerdo con un método ya descrito (Wu y col., 1991).

El curso temporal de la potenciación medida durante el bloqueo parcial por hexametonio pudo ajustarse, según lo ya descrito (Brown y McAfee, 1982), a una función doble exponencial:

$$P(t) = P e^{(-t / \tau_{PTP})} + L e^{(-t / \tau_{LTP})}$$

Donde los coeficientes P y L cuantifican la magnitud extrapolada de la potenciación de corto y largo plazo, respectivamente; y las constantes de tiempo τ_{PTP} y τ_{LTP} describen el curso temporal de cada componente de la potenciación postetánica (Brown y McAfee, 1982; Briggs y col., 1985a).

Análisis de los datos

El análisis estadístico de los datos se realizó mediante el programa InStat 2.0 (GraphPad Software) y se utilizaron, según el experimento, los siguientes tests: test t de Student para muestras pareadas y no pareadas; Análisis de la varianza de una vía seguido por test de Tukey o test de Dunnet. Los niveles de significación se indican en cada caso.

El ajuste de funciones modelo a los datos se realizó mediante el programa Inplot 4.0 (GraphPad Software) utilizando regresión lineal y no lineal según cada caso.

Soluciones

Solución HEPES: ClNa 140 mM, ClK 5 mM, Cl₂Ca 2.5 mM, Cl₂Mg 1 mM, glucosa 10 mM, HEPES 10 mM, ácido aminooxiacético 0.5 mM, ajustado a pH 7.4 con Tris base).

Solución HEPES K⁺ 40 mM: ClNa 105 mM, ClK 40 mM, Cl₂Ca 2.5 mM, Cl₂Mg 1 mM, glucosa 10 mM, HEPES 10 mM, ácido aminooxiacético 0.5 mM, ajustado a pH 7.4 con Tris base. (las soluciones con otras concentraciones finales de K⁺ [20, 60, 80 mM] siempre tuvieron reducida la concentración de ClNa en forma equimolar para preservar la osmolaridad total)

Solución HEPES bajo Ca²⁺ alto Mg²⁺: ClNa 140 mM, ClK 5 mM, Cl₂Ca 0, Cl₂Mg 3.5 mM, glucosa 10 mM, HEPES 10 mM, ácido aminooxiacético 0.5 mM, ajustado a pH 7.4 con Tris base).

Solución HEPES K⁺ 40 mM, bajo Ca²⁺, alto Mg²⁺: ClNa 105 mM, ClK 40 mM, Cl₂Ca 0, Cl₂Mg 3.5 mM, glucosa 10 mM, HEPES 10 mM, ácido aminooxiacético 0.5 mM, ajustado a pH 7.4

Solución Locke: ClNa 136 mM, ClK 5.6, Cl₂Ca 2.2 mM, Cl₂Mg 1.2, HEPES 20 mM, glucosa 7.6 mM, pH 7.3 ajustado con Tris base.

Drogas y reactivos utilizados:

Research Biochemicals Incorporated: (±)-baclofen, muscarina, carbacol, nicotina, norepinefrina, 2-hidroxisaclofen, dopamina, hemicolinio-3.

Sigma Chemical Company: atropina sulfato, d-tubocurarina, hexametonio, picrotoxina, muscimol, ácido gamma-aminobutírico, ácido aminooxiacético, histamina, β-alanina, ácido nipecotico, colina quinasa de levadura, trifosfato de adenosina, acetyl-coenzima A, tetrafenilboro, cloruro de colina, eserina, HEPES, Tris, bicuculina-metil ioduro, serotonina-creatinina sulfato, DNAsa I tipo IV.

RESULTADOS

Parte 1. Transporte y liberación de GABA

En esta primera parte presentaremos los resultados de los experimentos destinados a caracterizar mecanismos GABAérgicos que denominaremos presinápticos. En algunos casos el efecto de los distintos tratamientos sobre los parámetros relacionados al GABA se comparó con los resultados obtenidos para ACh en las mismas condiciones experimentales, dado que las propiedades básicas de la ACh como transmisor ganglionar son las que están mejor definidas.

1.1. Transporte de GABA.

Caracterización cinética

Hemos mencionado en la Introducción, que recientemente se ha remarcado la importancia de los transportadores de GABA para la acción de este aminoácido como mensajero intercelular en el sistema nervioso. Se asumen varias funciones posibles para los sistemas de transporte, entre ellas: 1) remover el transmisor del medio extracelular para contribuir a la terminación de la acción sináptica, mantener concentraciones extracelulares bajas y limitar espacialmente la acción; 2) proveer la concentración intracelular elevada de GABA necesaria para el llenado de las vesículas sinápticas; 3) mediar (operando en el sentido opuesto al de la captación) un mecanismo alternativo de liberación de transmisor gatillado por la despolarización de una manera diferente (Ca^{2+} -independiente) a la liberación vesicular, que depende del influjo de Ca^{2+} desde el medio extracelular (Adam-Vizi, 1992; Mager y col., 1993; Attwell y col., 1993; Lester y col., 1994).

En diversas regiones del SNC ante la presencia de ^3H -GABA en el medio extracelular el aminoácido marcado es acumulado por los componentes tisulares que expresan dichos transportadores. El objetivo de esta parte de nuestro trabajo fue caracterizar la captación de ^3H -GABA por GCS intactos en nuestras condiciones experimentales, así como también corroborar resultados previos que sugerían la presencia de mecanismos de transporte de GABA en esta preparación (Bowery y Brown, 1972; Bowery y col., 1979b).

Frente al agregado del aminoácido marcado con ^3H al medio extracelular ($10 \mu\text{Ci/ml}$, $0.110 \mu\text{M}$) por 30 min, el GCS efectivamente acumuló ^3H -GABA (Fig. 16A). La captación del aminoácido aumentó con la cantidad de tejido (1 a 4 ganglios, Fig. 16A) en forma lineal y mostrando que ganglios únicos acumulan cantidades de trazador suficientes para el análisis experimental, en todos los experimentos subsiguientes se analizó la radioactividad acumulada por ganglios individuales.

También se observó que la acumulación de ^3H -GABA aumenta linealmente con el tiempo de incubación, al menos entre 10 y 20 min (Fig. 16B). En todos los experimentos posteriores, por lo tanto, se utilizaron incubaciones de 10 min, tiempo al cual la velocidad aparente del proceso de transporte de GABA se mantiene en sus valores iniciales.

Igual que en otros sistemas de transporte de neurotransmisores, la velocidad del proceso de transporte de GABA aumenta al aumentar su concentración siguiendo un modelo de tipo Michaeliano donde, por analogía con los procesos enzimáticos (Erecinska, 1987), se considera como "sustrato" y "producto" al neurotransmisor extra e intracelular respectivamente y se definen una velocidad máxima V_{max} y una constante de transporte K_m (Erecinska, 1987).

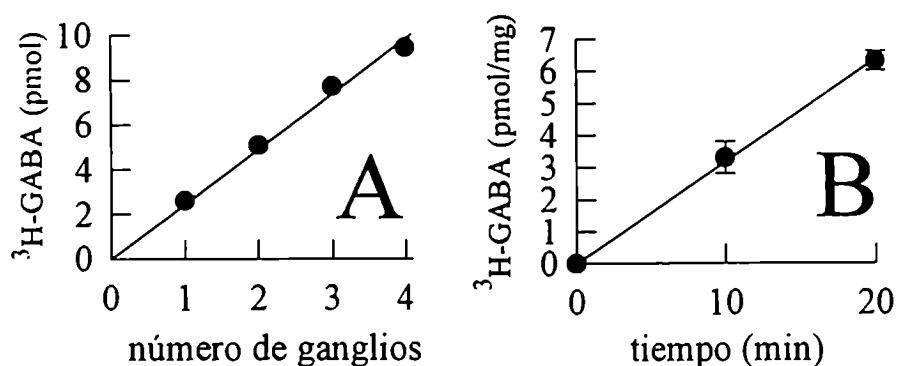


Figura 16. (A) El $^3\text{H-GABA}$ acumulado por el GCS, aumentó linealmente con la cantidad de tejido incubada (1, 2, 3 o 4 ganglios en cada punto); (B) La cantidad de $^3\text{H-GABA}$ acumulado por GCS únicos aumentó linealmente con el tiempo, al menos entre 0 y 20 min de incubación.

Como se puede observar en la Figura 17, cuando la captación de $^3\text{H-GABA}$ por el GCS se estudió agregando distintas concentraciones finales de GABA al medio extracelular (Fig. 17A: 2-100 μM , Fig. 17B: 100-400 μM), la velocidad de transporte de $^3\text{H-GABA}$ aumentó siguiendo en ambos casos una relación que pudo ser ajustada a un modelo de tipo Michaeliano.

Aplicando a los datos la transformación de dobles inversas de Lineweaver-Burk se pudieron detectar al menos dos sistemas de transporte, uno que denominamos de alta afinidad ($K_m = 22 \mu\text{M}$; $V_{max} = 56 \text{ pmol}/10 \text{ min}/\text{mg}$ de tejido; Fig. 17A) y otro de baja afinidad ($K_m = 195 \mu\text{M}$; $V_{max} = 180 \text{ pmol}/10 \text{ min}/\text{mg}$ de tejido; Fig. 17B).

Los resultados obtenidos tras el análisis de las variaciones de la velocidad de acumulación de $^3\text{H-GABA}$ en función de su concentración extracelular sugieren que el tejido nervioso del GCS contiene elementos celulares que poseen un número finito, saturable, de transportadores para GABA, en forma similar a lo descrito en el SNC. En lo aparente, existen al menos dos mecanismos de captación de GABA (de alta y baja afinidad) los cuales podrían corresponderse con dos sistemas transportadores o con dos estados distintos de un mismo sistema.

En preparaciones de tejido de SNC, se han detectado múltiples sistemas de transporte de GABA con K_m s aparentes que varían en un rango relativamente amplio y han sido clasificados como de afinidad baja, intermedia o alta (Wood y Sidhu, 1987). En el GCS en particular, previamente sólo habían sido descritos procesos de captación de GABA con K_m s aparentes de valor cercano al que en este trabajo denominamos de alta afinidad (7 μM , Bowery y Brown 1972; 6.75 μM , Bowery y col., 1979b).

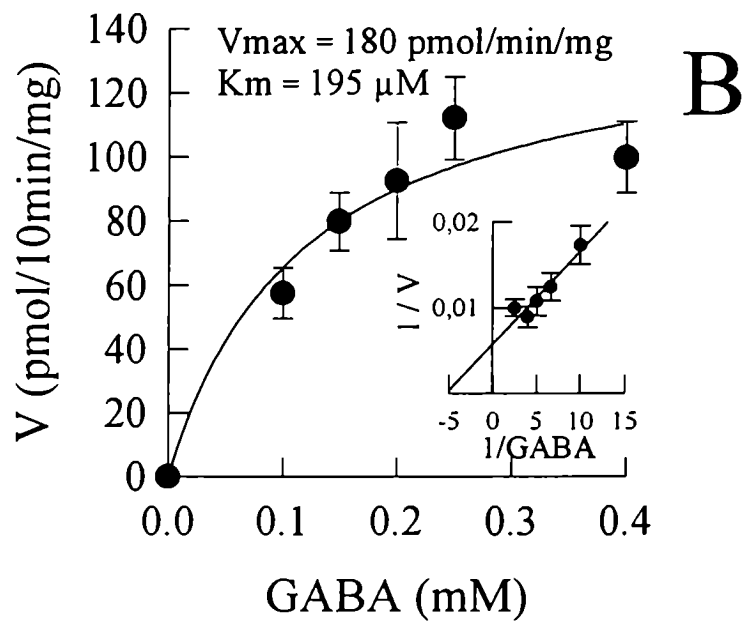
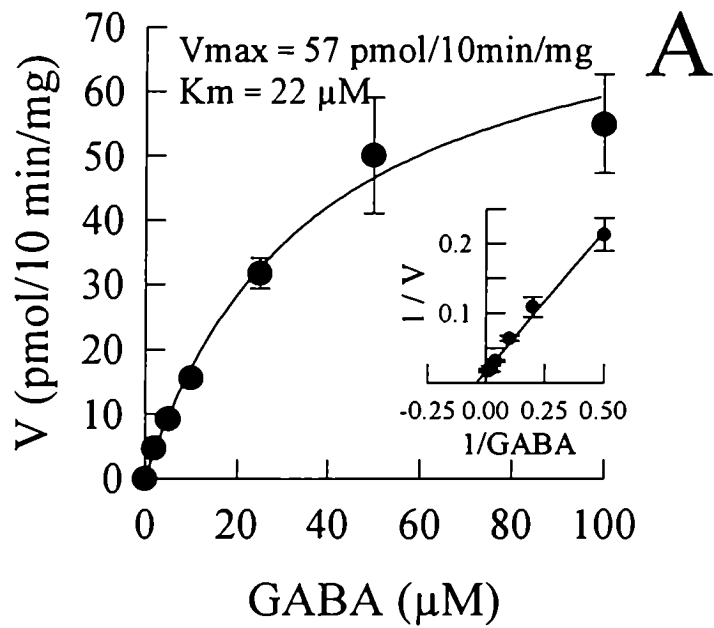


Figura 17. Caracterización cinética del transporte de ^3H -GABA en el GCS. Ganglios individuales ($n = 5$) se incubaron 10 min en presencia de distintas concentraciones finales de ^3H -GABA (A: 2, 5, 10, 25, 50, 100 μM ; B: 0.1, 0.15, 0.20, 0.25, 0.40 mM). Los parámetros K_m y V_{max} se calcularon tras ajustar una regresión lineal a los datos tras aplicarles la transformación de dobles inversas de Lineweaver-Burk.

Farmacología

En el SNC existen distintos tipos de transportadores para GABA que se pueden distinguir en base a la actividad de distintos inhibidores farmacológicos (Borden y col., 1992; Clark y col., 1992). Como parte de este trabajo se quiso establecer si la captación de GABA en el GCS es sensible a alguno de los compuestos que inhiben a los transportadores en el SNC, en particular el 2,4-diaminobutirato (2,4-DABA), inhibidor selectivo de la captación por neuronas (Iversen y Kelly, 1975; Schousboe y col., 1979); la β -alanina, que inhibe selectivamente la captación glial (Iversen y Kelly, 1975; Schousboe y col., 1979) y el ácido nipecótico, inhibidor de ambos sistemas de transporte (Krogsgaard-Larsen y Johnston, 1975; Schousboe y col., 1979).

Inicialmente analizamos el efecto de estas drogas aplicadas en dos concentraciones finales (0.5 mM y 10 mM) al medio de incubación en presencia de ^3H -GABA (0.5 μM final). Como puede observarse en la Tabla 2, los tres compuestos inhibieron significativamente el transporte de ^3H -GABA aunque solo el ácido nipecótico mostró una actividad comparable a la del GABA "frío", que actúa como un inhibidor competitivo no selectivo de la captación de ^3H -GABA.

Tabla 2. Inhibición del transporte de ^3H -GABA en el GCS por GABA, ácido nipecótico, β -alanina y 2,4-DABA.

Grupo experimental	Captación de ^3H -GABA (pmol/mg de tejido)
control	4.87 \pm 0.41
GABA 0.5 mM	0.50 \pm 0.05 *
GABA 10 mM	0.34 \pm 0.04 *
ácido nipecótico 0.5 mM	0.57 \pm 0.06 *
ácido nipecótico 10 mM	0.45 \pm 0.01 *
β -alanina 0.5 mM	1.77 \pm 0.21 *
β -alanina 10 mM	0.95 \pm 0.04 *
2,4-DABA 0.5 mM	3.50 \pm 0.44 *
2,4-DABA 10 mM	0.55 \pm 0.03 *

El tejido fue incubado por 10 min en presencia de los distintos compuestos y luego por 10 min con ^3H -GABA (concentración final = 0.5 μM) en ausencia (grupo control), la acumulación de ^3H -GABA se determinó de acuerdo con lo descrito en Materiales y Métodos. Se expresa la media \pm e.s. (n = 6 en cada grupo). *: p < 0.01 comparado con el control. ANOVA seguido por test de Dunnett.

Los resultados expuestos en la Tabla 2 sugirieron la presencia tanto de transportadores sensibles a β -alanina así como al 2,4-DABA. Para caracterizar mejor la actividad de estos inhibidores sobre el transporte de GABA, seguidamente se analizó su efecto en un rango mayor de concentraciones y los resultados se expresaron en forma de curvas concentración-respuesta.

Como se muestra en la Figura 18, el GABA y el ácido nipecótico, que no discriminan entre captación glial y neuronal, produjeron el mayor efecto inhibitorio. La inhibición del transporte por β -alanina fue menor que la producida por GABA o nipecótico y en varias concentraciones, mayor que la desarrollada por 2,4-DABA (Fig. 18). A concentraciones altas, el efecto de ambas drogas fue estadísticamente indistinguible, posiblemente porque a altas concentraciones la acción de estos inhibidores pierda parte de su selectividad.

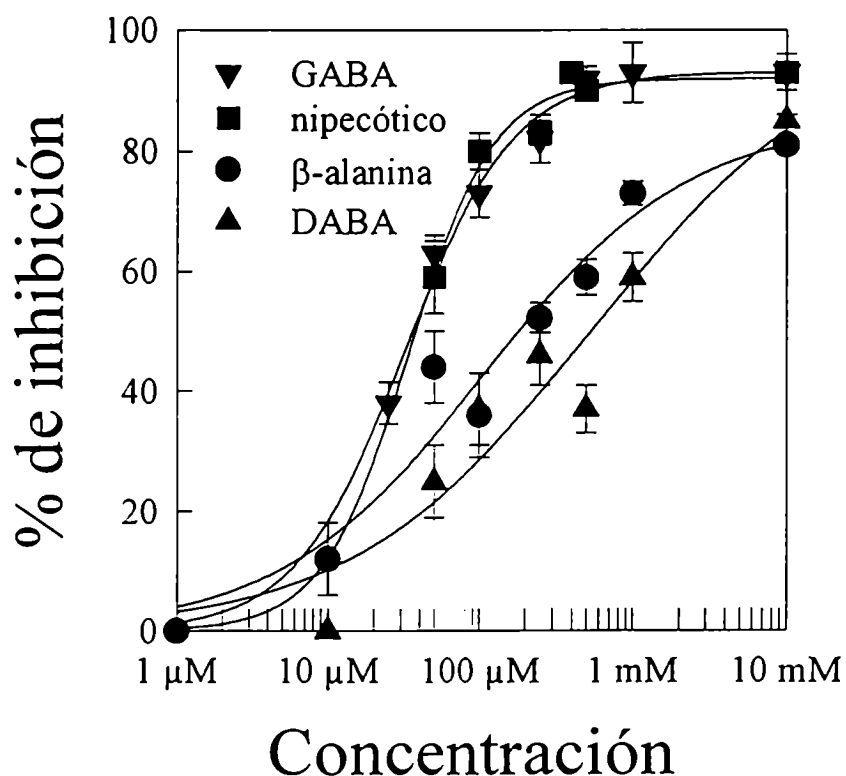


Figura 18. Efecto de concentraciones crecientes de GABA, ácido nipecótico, β -alanina y 2,4-DABA sobre la captación de ^3H -GABA por el GCS. Se grafica el % de inhibición de la captación total de GABA. En cada caso se ajustó por regresión no lineal una curva sigmoidea (—) a partir de la cual se calculó la CI_{50} mostrada en la Tabla 3.

Para cada droga, se pudo ajustar una curva sigmoidea a los datos y por interpolación se calcularon los respectivos valores de CI_{50} (concentración que produce el 50 % del efecto inhibitorio máximo) que se muestran en la Tabla 3. Asumiendo que

a la concentración de $^3\text{H-GABA}$ utilizada en estos experimentos ($0.5 \mu\text{M}$) opera predominantemente el (o los) transporte de alta afinidad, se calcularon también los valores de K_i (constante de inhibición) según la relación de Cheng y Prusoff (Cheng y Prusoff, 1973; Craig, 1993).

Tabla 3. Efecto de los inhibidores del trans-porte de $^3\text{H-GABA}$: parámetros de las curvas concentración-respuesta.

Inhibidor	CI_{50} (μM)	K_i (μM)
GABA	33.5 ± 3.6	32.75
ácido nipecotico	31.7 ± 1.1	30.99
β -alanina	$113.3 \pm 27.6 *$	110.5
2,4-DABA	$684.3 \pm 232 *, \#$	668.9

Los valores de CI_{50} se estimaron de las curvas sigmoideas ajustadas en la Fig. 18. K_i se calculó de acuerdo a la relación de Cheng y Prusoff. * : $p < 0.05$ versus GABA. # $p < 0.05$ versus β -alanina, ANOVA, Test de Tukey.

Los resultados obtenidos en esta parte del trabajo sugieren que el transporte de alta afinidad para GABA en el GCS se inhibe por efecto de drogas que afectan los transportadores de tipo glial (β -alanina), de tipo neuronal (2,4-DABA) o a ambos (ácido nipecótico). Aunque probablemente no reflejen en forma directa la afinidad de la droga por el transportador, los datos de K_i aparente obtenidos muestran que el 2,4-DABA fue el inhibidor menos potente. El comportamiento farmacológico sugiere que en este ganglio simpático el GABA se acumula en sitios posiblemente similares a los compartimentos glial y neuronal del SNC.

Estos resultados no descartan la posibilidad de que se trate de un único compartimento de captación con un transportador de alta afinidad sensible tanto a inhibidores del transporte glial como neuronal (Borden y col., 1992); sin embargo, resultados que serán presentados más adelante nos permiten sugerir que la acumulación de $^3\text{H-GABA}$ que es inhibida por β -alanina ó 2,4-DABA se "dirige" a compartimentos tisulares distintos.

Efecto de la desnervación preganglionar

En el tronco simpático cervical (TSC) existen axones GABA-inmunoreactivos que ingresan al GCS, identificados mediante técnicas de inmunocitoquímica, usando anticuerpos específicos anti-GABA (Dobo y col., 1988). Probablemente estas fibras sean las prolongaciones de neuronas GABAérgicas interganglionares (Wolff y col., 1993) y no axones de neuronas preganglionares.

Para evaluar en qué proporción contribuyen estas fibras a la acumulación de $^3\text{H-GABA}$ por el GCS, examinamos la captación del aminoácido marcado en GCS provenientes de ratas a las que se practicó una sección unilateral del TSC. Los experimentos se realizaron 12 a 15 días

post-cirugía, tiempo al cual los segmentos distales de los axones, separados en forma permanente del cuerpo neuronal, se hallan en un estado avanzado o han completado el proceso de degeneración walleriana (Joo y col., 1971; Jessell, 1991). Estos animales mostraron caída irreversible del párpado en el lado ipsilateral a la operación pero no en el lado contralateral (al cual se le realizó una operación simulada); esto constituyó una prueba funcional de la efectividad del procedimiento quirúrgico.

En experimentos realizados en paralelo, se determinó el efecto de la sección del TSC sobre la capacidad del GCS de captar ^3H -colina y de sintetizar ^3H -ACh a partir de ^3H -colina, indicadores bioquímicos a veces usados como marcadores, respectivamente, de la presencia de transportadores de colina y de actividad enzimática Colina Acetil Transferasa (CAT) y por lo tanto de terminales colinérgicos.

En la Figura 19 se observa que la captación de GABA tritiado por los ganglios desnervados fue básicamente indistinguible de la de los ganglios con operación simulada (Fig. 19A), mostrando que la acumulación de ^3H -GABA medida en nuestras condiciones no se afecta por la eliminación de las fibras que viajan a través del TSC.

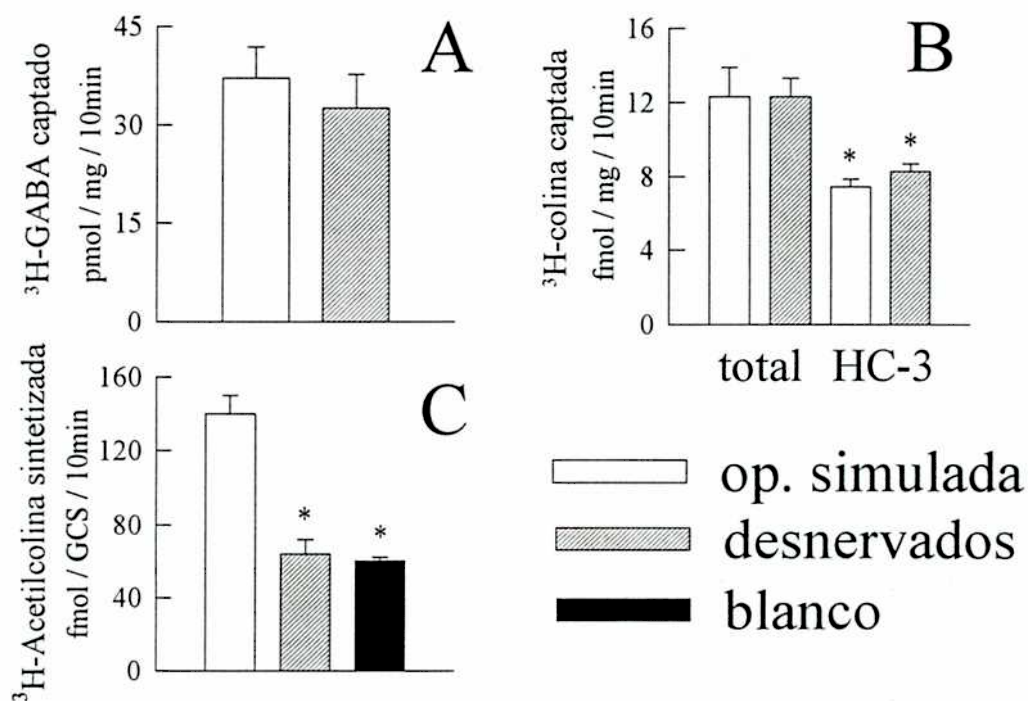


Figura 19. Efecto de la desnervación preganglionar crónica (sección del TSC, 12 a 15 días antes del experimento) sobre la captación específica de ^3H -GABA (A) y la de ^3H -Ch (B). También se muestra el efecto de la desnervación sobre la síntesis de ACh mediada por la CAT (C). En B, * = $P < 0.05$ respecto de total. En C, * = $P < 0.05$ respecto de operación simulada. Test t de Student. HC-3 = hemicolinio-3 25 μM .

Se puede apreciar en la Fig. 19B, que la desnervación tampoco afectó la acumulación de ^3H -colina, tal como se describió previamente (Bowery y Neal, 1975; Collier y Katz, 1974).

En contraste, la conversión enzimática de ^3H -colina en ^3H -ACh (mediada por la CAT), fue totalmente eliminada por la sección del TSC (Fig. 19C).

La desaparición de la actividad CAT es una prueba adicional (sumada a la ptosis palpebral observada *in vivo*) de la efectividad de la desnervación y de la falta de reinervación significativa al momento de estos experimentos. Sin embargo, pese a que la gran mayoría de las fibras en el TSC son colinérgicas y son la única fuente reconocida de terminales colinérgicos en los ganglios simpáticos (McGeer, 1978 citado en Farkas y col., 1986), la captación de ^3H -colina no se alteró tras la desnervación (Fig. 19B), coincidiendo con resultados reportados por otros grupos (Collier y Katz, 1974; Bowery y Neal, 1975; Kuhar y Murrin, 1978).

Trabajos previos de otros investigadores muestran también que la CAT es un mejor indicador de la presencia de terminales colinérgicos preganglionares ya que tras la desnervación crónica no se detecta con métodos bioquímicos (Collier y Katz, 1974; Bowery y Neal, 1975) ni inmunohistoquímicos (Kasa y col., 1991).

Los resultados obtenidos muestran que la captación específica de GABA en el GCS no se altera por la desnervación, pero en principio no se puede descartar que para el GABA ocurra algo similar a lo descrito (en este trabajo y en trabajos previos) para la acumulación de ^3H -colina. Un camino alternativo es analizar el efecto de la desnervación preganglionar sobre la liberación inducida de GABA (y ACh), que en teoría sólo es posible tras la captación específica del transmisor tritiado hacia sitios "liberables". Esta posibilidad se contempla en la Parte 1.2.

1.2. Liberación de GABA

Efecto de la elevación de la $[\text{K}^+]_e$

Los resultados descritos en la sección anterior muestran la presencia, en el GCS, de elementos con capacidad de acumular ^3H -GABA con alta afinidad y con sensibilidad farmacológica a inhibidores clásicos del transporte de este aminoácido. Sin embargo, estos resultados no indican si la acumulación de GABA está dirigida, al menos en parte, a compartimentos desde donde pueda ser subsiguientemente liberado en respuesta a la despolarización, el estímulo que normalmente dispara la liberación de neurotransmisor.

Para evaluar esta posibilidad, utilizamos una metodología neuroquímica que consiste en provocar despolarización por elevación de la $[\text{K}^+]_e$, es decir modificando el potencial de equilibrio del K^+ . Al aplicar este procedimiento al medio de superfusión de tejido que previamente acumuló transmisor marcado, se espera observar un incremento de la cantidad de radioactividad colectada en el medio de superfusión, si es que efectivamente la despolarización puede ser acoplada a un aumento de la liberación.

En la Fig. 20A se muestran los resultados de un experimento representativo donde se analizó el eflujo de ^3H al medio de superfusión de GCS marcados con ^3H -GABA de acuerdo con lo descrito en Materiales y Métodos. En la Fig. 20A se puede observar que la elevación de la $[\text{K}^+]_e$ desde 5 mM (condiciones basales) hasta 20 y 40 mM (indicado por las barras) se asocia a un aumento del eflujo del ^3H que se colecta en el medio de superfusión. La Fig. 20B muestra que la liberación suprabasal de ^3H -GABA (cuantificada según lo descrito en la

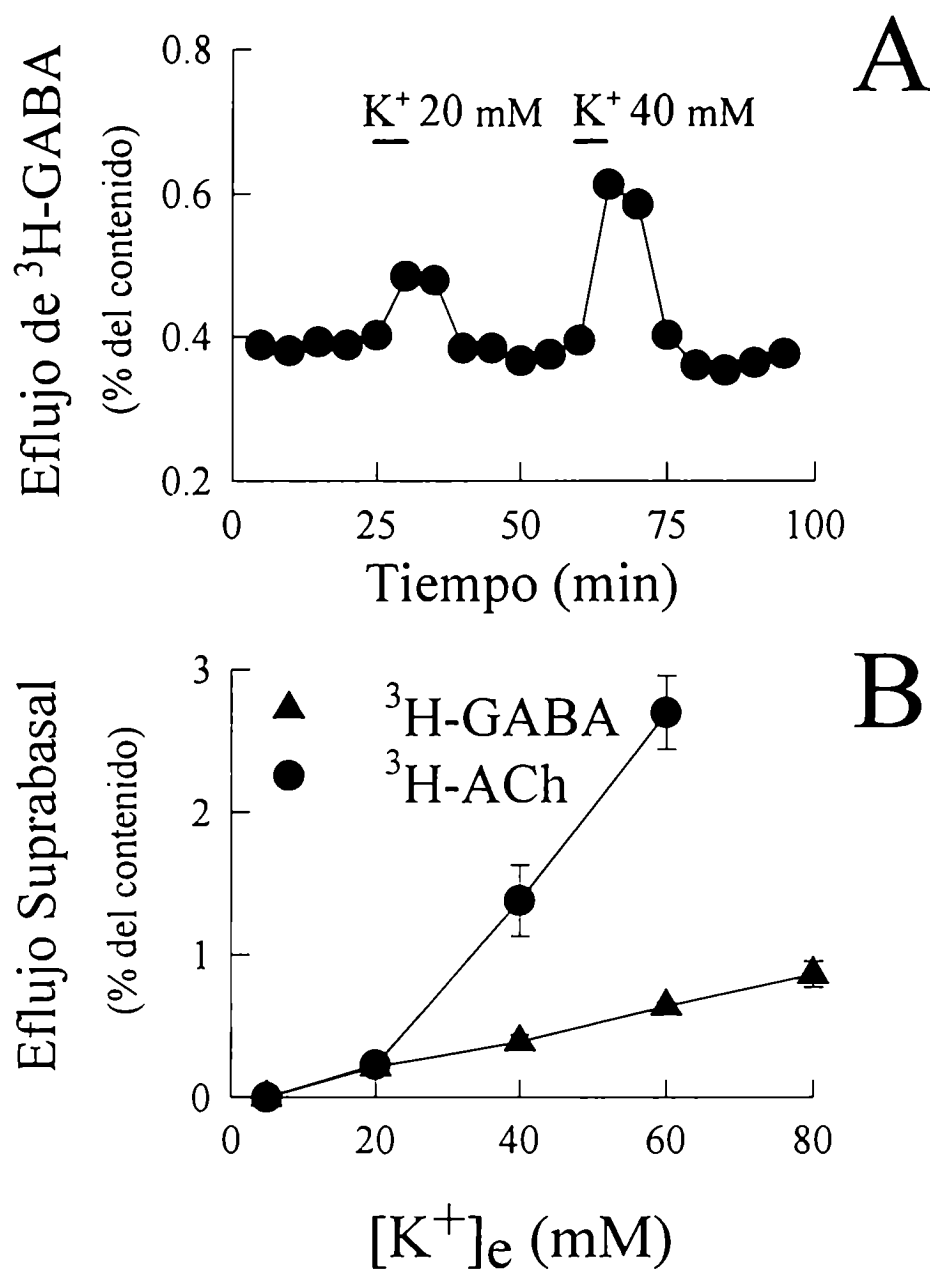


Figura 20. (A) Resultados de un experimento típico en el cual se estudió el efecto de la elevación del K^+ externo en el medio de perfusión de GCS marcados con $^3\text{H-GABA}$. El ^3H se colectó cada 5 min (2 ml) y se lo normalizó como el % del ^3H contenido por el tejido en cada momento. (B) Liberación suprabasal de GABA ó ACh por efecto de distintas concentraciones de K^+ en el medio de perfusión. La liberación suprabasal se estimó de acuerdo a lo descrito (ver Fig. 11)

sección de Materiales y Métodos), varía linealmente con la $[K^+]_e$, al menos en el rango de concentraciones ensayado (20 a 80 mM) y puede ser detectada a partir de $[K^+]_e$ relativamente bajas (20 mM).

Con fines comparativos, en la Fig. 20B también se grafican los resultados obtenidos en experimentos similares donde se analizó la liberación de 3H -ACh tras marcar el tejido con 3H -colina según lo descrito en Materiales y Métodos. Como puede verse, la liberación suprabasal de 3H -ACh fue significativamente mayor que la de 3H -GABA a partir de $[K^+]_e$ mayores que 20 mM. Esta diferencia sugiere que los mecanismos de acoplamiento entre despolarización y liberación son distintos para ACh y GABA en esta preparación, en particular dicho acoplamiento parece ser más eficiente para la liberación de ACh.

Dependencia con el Ca^{2+} externo.

De acuerdo con la clásica "hipótesis del Calcio" (Katz, 1969; Dunlap y col., 1995), la liberación exocitótica de los transmisores almacenados en vesículas depende del influjo de Ca^{2+} externo a través de canales voltaje-dependientes activados por despolarización. Usualmente se acepta que el GABA se almacena en los terminales nerviosos en vesículas pequeñas y ovaladas (Kelly, 1993) y por lo tanto que sigue el modelo clásico de liberación Ca^{2+} -dependiente.

Sin embargo, ya mencionamos que el GABA (y los aminoácidos neurotransmisores en general) pueden liberarse además por mecanismos no vesiculares independientes del Ca^{2+} extracelular (Schwartz, 1987; Bernath, 1992; Adam-Vizi, 1992; Cammack y Schwartz, 1993; Levi y Raiteri, 1993; Attwell y col., 1993; Amara, 1993; Lester y col., 1994). La liberación no vesicular es mediada por los mismos transportadores que median la recaptación de GABA pero operando en el sentido opuesto; esta inversión del sentido del transporte está de alguna manera acoplada a la despolarización (Schwartz, 1987; Cammack y Schwartz, 1993; Levi y Raiteri, 1993; Attwell y col., 1993; Lester y col., 1994).

En la Figura 21 se observan los resultados de experimentos individuales en los que la liberación de 3H -GABA se evocó elevando el $[K^+]_e$ hasta 20 mM (izquierda) ó 50 mM (derecha); en medio con Ca^{2+} normal (arriba) ó con Ca^{2+} reemplazado por Mg^{2+} (abajo); se observa que en ausencia de Ca^{2+} , sólo disminuyó el eflujo de 3H -GABA en respuesta al $[K^+]_e$ 20 mM. La Figura 22 resume los resultados de estos experimentos. En la mayor parte de los casos, la respuesta al $[K^+]_e$ 20 mM fue casi totalmente (~ un 90 %) eliminada en medio libre de Ca^{2+} y con exceso de Mg^{2+} , fue marcadamente reducida por el quelante específico de Ca^{2+} , EGTA (10 mM) y en menor grado por el verapamil (50 μ M), un bloqueante de los canales de calcio voltaje dependientes tipo L (Bertolino y Llinas, 1992) (Fig. 22). En contraste, la liberación de 3H -GABA evocada por K^+ 50 mM no fue, en ninguna de las condiciones experimentales mencionadas, significativamente diferente de la observada en solución externa con $[Ca^{2+}]_e$ normal (Figuras 21 y 22).

La liberación de 3H -ACh evocada por elevación de la $[K^+]_e$ fue, en cambio, claramente reducida (aproximadamente un 85 %) en ausencia de Ca^{2+} externo y exceso de Mg^{2+} a las dos $[K^+]_e$ examinadas (Figura 22).

Estos resultados muestran que la liberación de 3H -GABA que se desarrolla en respuesta a la elevación sostenida del K^+ externo, difiere según el nivel de despolarización: un 90 % de la liberación evocada por $[K^+]_e$ 20 mM es Ca^{2+} -dependiente, en tanto que la evocada a $[K^+]_e$ 50 mM no es dependiente de la presencia de Ca^{2+} extracelular. Si bien podía esperarse que los componentes

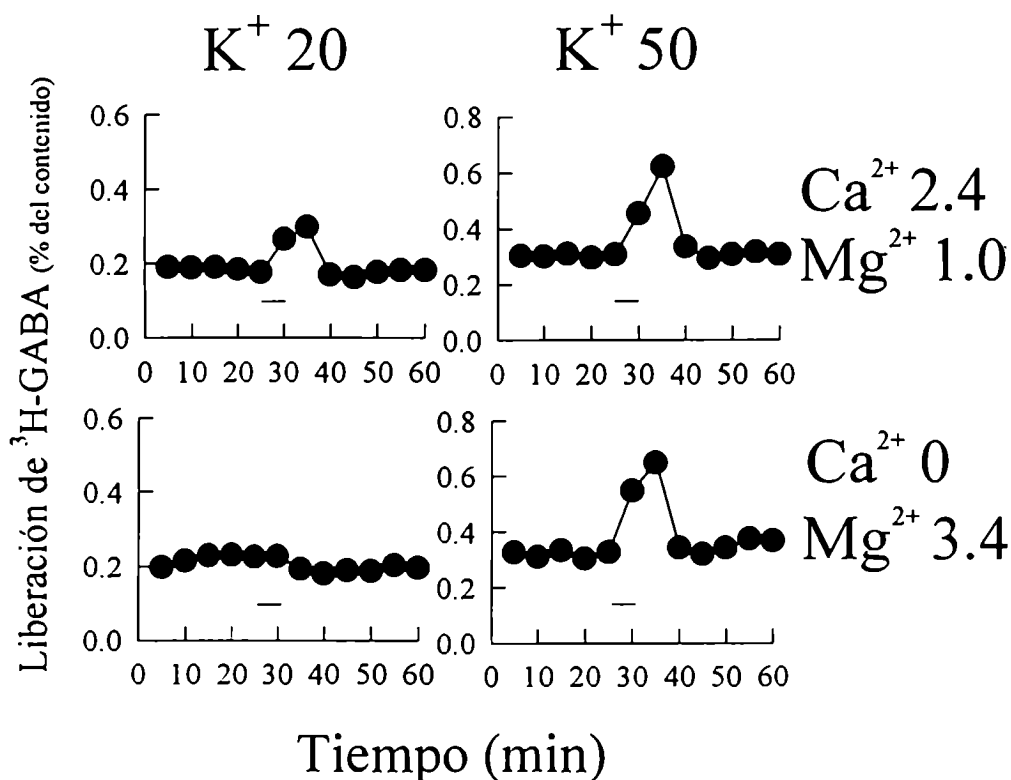


Figura 21. Experimentos representativos que muestran el efecto de la solución Locke con bajo Ca^{2+} y alto Mg^{2+} (abajo) sobre la liberación de ^3H -GABA inducida por K^+ 20 (izquierda) ó 50 mM (derecha), comparado con el obtenido en solución Locke normal (arriba). En estos experimentos, la solución con bajo Ca^{2+} se aplicó 5 min antes y durante la perfusión con alto K^+ , la cual se señala con una barra bajo los puntos en cada gráfico.

dependiente e independiente del Ca^{2+} extracelular fueran aditivos, es decir que a $[\text{K}^+]_e$ 50 mM se sumara un "nuevo" componente de liberación Ca^{2+} -independiente, nuestros resultados muestran lo contrario. Es posible que a $[\text{K}^+]_e$ 50 mM el componente que depende del Ca^{2+} se vea enmascarado o que algún mecanismo voltaje-dependiente que contribuya a la liberación de GABA se inactive al potencial de membrana alcanzado a esta $[\text{K}^+]_e$.

Si bien también se observó un componente Ca^{2+} -independiente para la liberación de ^3H -ACh, éste fue minoritario y prácticamente constante (15 %) a ambas $[\text{K}^+]_e$, sugiriendo que mecanismos idénticos o similares dominan la liberación de ACh a ambos niveles de despolarización.

Una explicación posible para estas diferencias entre la liberación de GABA y ACh en el GCS, es que para el aminoácido además de la liberación excitotóxica puedan contribuir también los mecanismos mediados por los transportadores que, como ya mencionáramos, han sido postulados como fisiológicamente importantes para la liberación de aminoácidos pero no para la de ACh (Arias y Tapia, 1986; Adam-Vizi, 1992; Attwell y col., 1993; Levi y Raiteri, 1993).

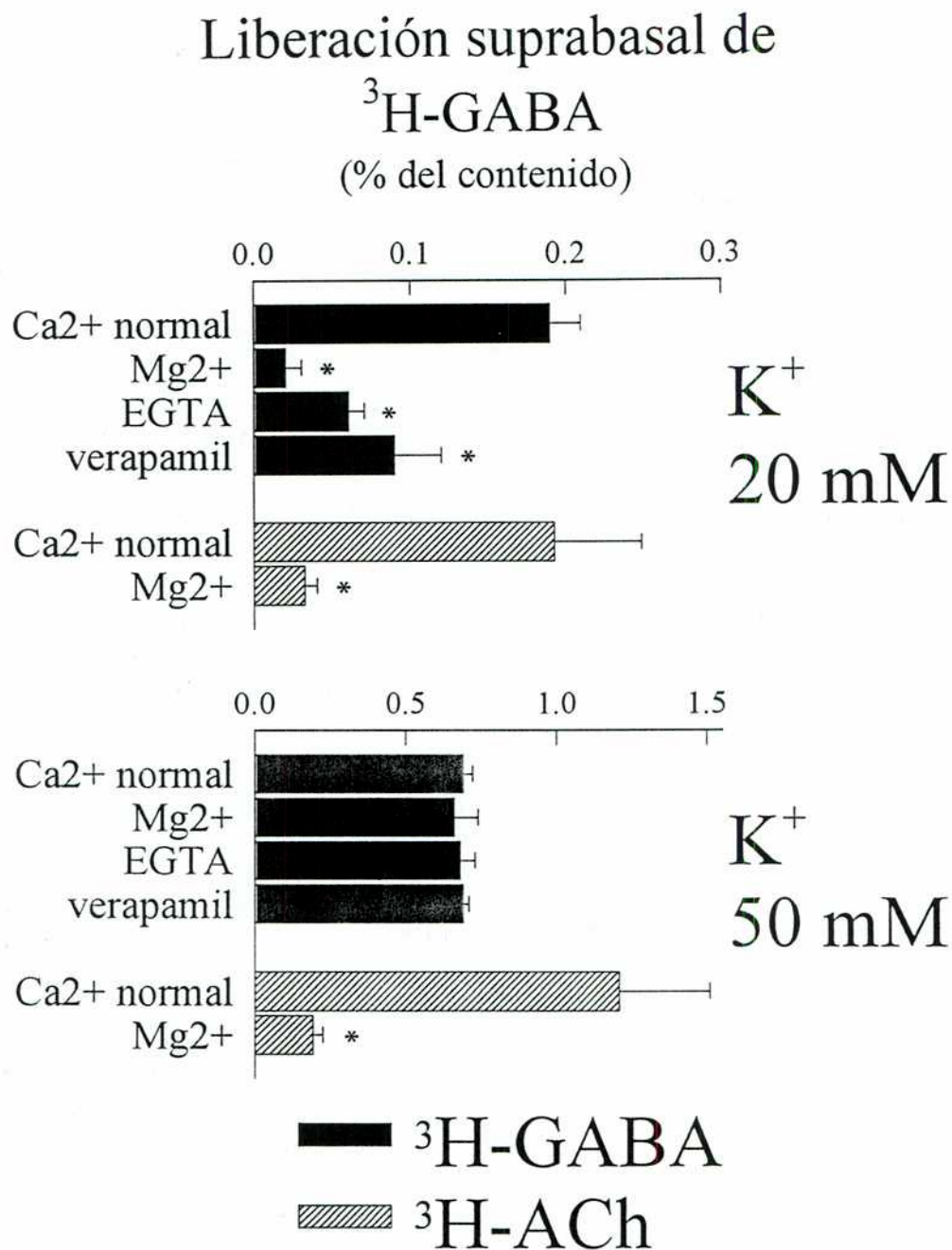


Figura 22. Resumen de los experimentos en los que se analizó la dependencia respecto del Ca^{2+} extracelular de la liberación de $^3\text{H-GABA}$ y $^3\text{H-ACh}$ en el GCS. Los distintos tratamientos consistieron en modificaciones de la solución de perfusión por agregado y/o reemplazo según se resume a continuación, Mg^{2+} : Ca^{2+} 0, Mg^{2+} 3.4 mM; EGTA: Ca^{2+} 0, EGTA 10 mM, Mg^{2+} 1.0 mM; verapamil: verapamil 50 μM , Ca^{2+} 2.4 mM, Mg^{2+} 1.0 mM. La solución a testear se aplicó 5 min antes y durante la perfusión con alto K^+ . * = $P < 0.05$ versus Ca^{2+} normal, test t de Student ó ANOVA seguido por test t de Dunnett. La liberación suprabasal se estimó de acuerdo a lo descrito (ver Fig. 11).

Efecto de inhibidores de los transportadores.

Además de la falta de dependencia respecto del Ca^{2+} externo (Adam-Vizi, 1992; Levi y Raiteri, 1993; Lester y col., 1994), un hallazgo típicamente asociado a la liberación mediada por transportadores es el aumento del eflujo de GABA al medio extracelular en respuesta a la aplicación de inhibidores de la captación que sean en sí mismos sustrato de los transportadores (Solís y Nicoll, 1992; Levi y Raiteri, 1993; Isaacson y col., 1993). Estos compuestos, son transportados hacia el interior celular (Iversen y Kelly, 1975; Johnston y Stephanson, 1976; Cammack y Schwartz, 1993; Mager y col., 1993) y desplazan al GABA intracelular a través de un mecanismo (farmacológico) denominado intercambio heterólogo (heteroexchange, Johnston y Stephanson, 1976; Walz, 1985; Levi y Raiteri, 1993; Solís y Nicoll, 1992; Isaacson y col., 1993).

Debido a que previamente observamos que la captación de GABA en el GCS es sensible a inhibidores farmacológicos de la captación tales como el ácido nipecótico, la β -alanina y el 2,4-DABA y a que los tres son por sí mismos transportables (Iversen y Kelly, 1975; Johnston y Stephanson, 1976), decidimos ensayar el efecto de su agregado al medio de perfusión de ganglios marcados con ^3H -GABA.

En la Figura 23 (izquierda) se muestran los resultados de tres experimentos individuales e independientes en los que se agregó al medio de perfusión normal uno de los tres compuestos mencionados en concentraciones crecientes. Puede verse que las tres drogas causan un aumento concentración-dependiente del eflujo de ^3H -GABA, que se detecta a partir de una concentración 10 μM .

El 2,4-DABA fue el compuesto aparentemente menos efectivo para provocar el aumento del eflujo, mientras que el efecto de la β -alanina y el ácido nipecótico fue aproximadamente similar (Fig. 23, derecha). Los resultados sugieren que en el GCS el ^3H -GABA se almacena en compartimientos desde los cuales puede intercambiarse tanto con sustratos de los transportadores gliales (β -alanina y ácido nipecótico) como de los neuronales (2,4-DABA y ácido nipecótico).

Alternativamente al intercambio heterólogo, el aumento en el eflujo evocado por 2,4-DABA, β -alanina y nipecótico podría deberse a un bloqueo de la recaptación del transmisor liberado, si el eflujo basal observado de GABA fuese resultante de un balance entre liberación espontánea y recaptación, como se ha sugerido anteriormente (Bowery y col., 1976).

Si el aumento observado en el eflujo de ^3H -GABA es, por lo menos en parte, consecuencia de un intercambio heterólogo mediado por transportador, dicho aumento no debería disminuir ante la falta de Ca^{2+} extracelular. Esta posibilidad fue probada aplicando 2,4-DABA y β -alanina en un medio de perfusión libre de Ca^{2+} (Ca^{2+} 0, EGTA 10 mM).

Los resultados obtenidos en esta serie de experimentos se grafican en la Figura 24. En los paneles A y B se muestran resultados de experimentos representativos en los que se agregaron 2,4-DABA y β -alanina al medio de perfusión con o sin Ca^{2+} extracelular. Como puede verse, en medio libre de Ca^{2+} aumentó significativamente la liberación suprabasal inducida por 2,4-DABA y β -alanina y también aumentó significativamente el eflujo basal de transmisor ($89 \pm 36\%$). El motivo de este aumento no es claro aunque puede estar relacionado con la despolarización que

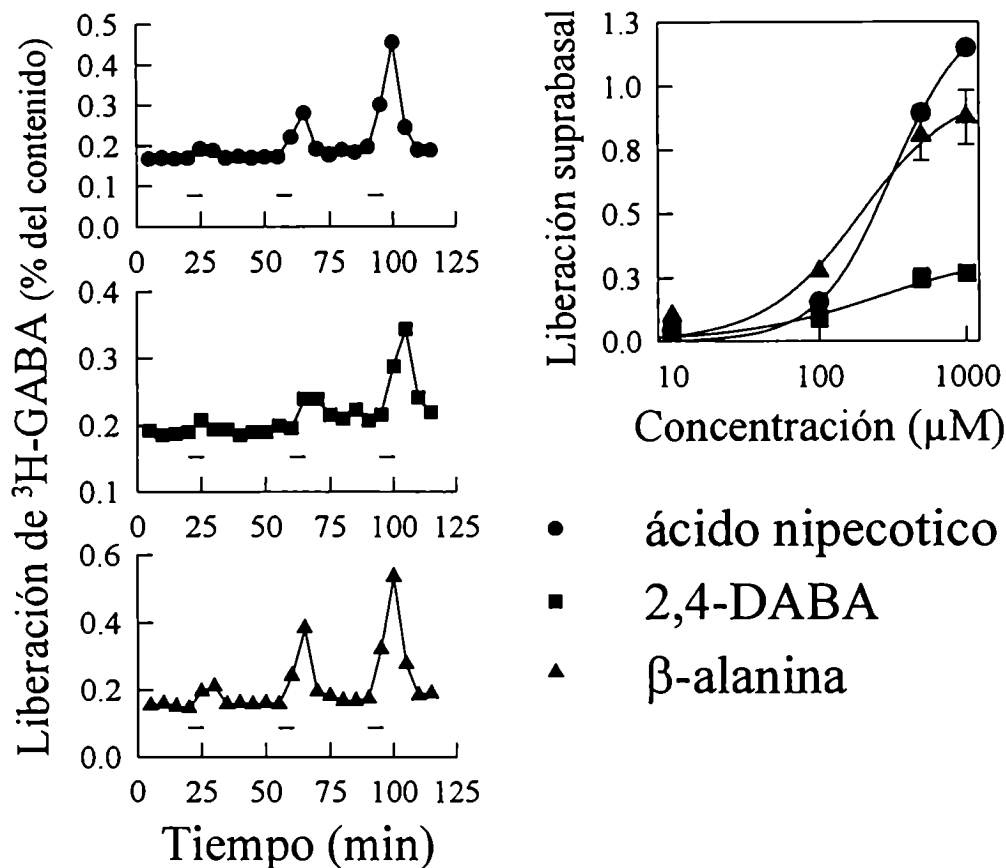


Figura 23. (Izquierda) Experimentos típicos que muestran el efecto del ácido nipecótico (arriba), 2,4-DABA y β -alanina, sobre el flujo espontáneo de ^3H -GABA en el GCS. Los inhibidores/sustratos de la captación se agregaron al medio de perfusión por 5 min de acuerdo a lo indicado por las barras debajo de los puntos. (Derecha) Relación concentración-efecto para el flujo suprabasal evocado por los inhibidores/sustratos.

experimentan las membranas excitables en ausencia de Ca^{2+} (Junge, 1992b). En experimentos independientes en los que la secuencia Ca^{2+} normal \rightarrow libre de Ca^{2+} se invirtió (comparar las Figura 24A y B) se obtuvieron básicamente los mismos resultados, indicando que al menos en lo que respecta a la liberación de ^3H -GABA, la perfusión sostenida con medio libre de Ca^{2+} no tiene efecto deletéreo sobre la preparación (Junge, 1992b).

El gráfico de barras de la Figura 24C resume los resultados obtenidos en estos experimentos con 2,4-DABA y β -alanina. Dado que la liberación inducida por los compuestos mencionados no disminuye por falta de Ca^{2+} externo, los resultados son compatibles con la idea de un mecanismo de intercambio heterólogo. El incremento en la liberación de GABA en condiciones de bajo Ca^{2+} ha sido descrito en otras regiones del sistema nervioso donde también se ha postulado que opera la liberación mediada por transportadores (Sihra y col., 1984; Bernath y Zigmond, 1990).

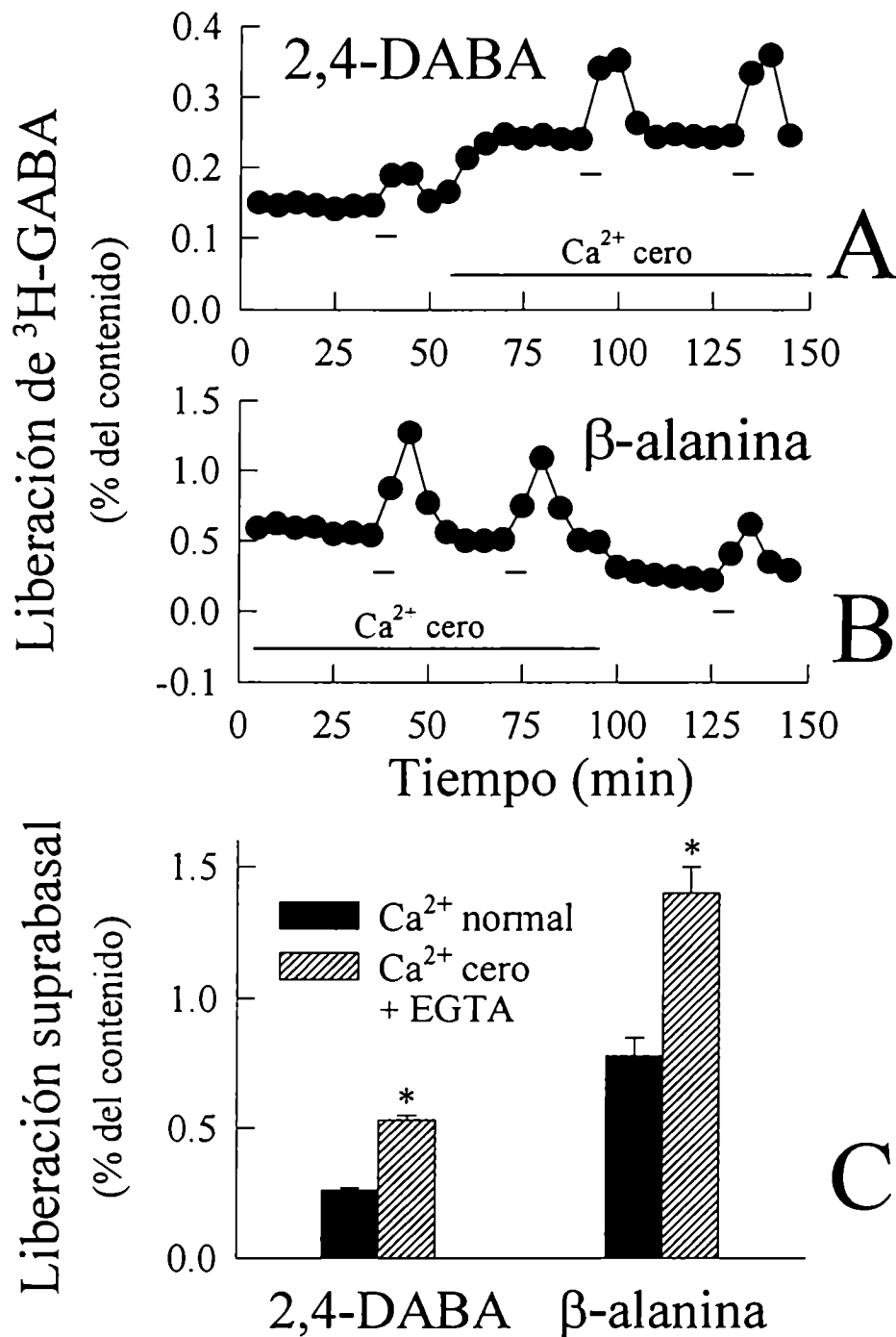


Figura 24. Efecto del bajo Ca²⁺ sobre el flujo de ³H-GABA inducido por sustratos de los sistemas de transporte. (A) y (B) Experimentos representativos, el efecto de 2,4-DABA y β-alanina se examinó en solución Locke normal o en solución libre de Ca²⁺ (Ca²⁺ 0, Mg²⁺ 1.0 mM, EGTA 5 mM), la aplicación de las drogas se señala con las barras bajo los puntos. (C) Aunque en bajo Ca²⁺ aumentó el flujo basal, se observó un aumento significativo de la liberación supra-basal. * = P < 0.05 test t de Student. Se muestran media ± e.s. n = 4.

Efecto de la desnervación preganglionar y preincubación en presencia de inhibidores del transporte.

Los experimentos realizados en este trabajo para estudiar el efecto de la desnervación preganglionar crónica sobre la captación de ^3H -GABA mostraron que la acumulación de ^3H -GABA no se ve afectada, en nuestras condiciones experimentales, por la operación.

Experimentos realizados por otros grupos usando técnicas de inmunohistoquímica y autorradiografía indican que en esta preparación, a diferencia de la ACh, el GABA puede acumularse en elementos gliales y neuronales locales (Young y col., 1973; Wolff y col., 1986), cuya presencia en principio no debería ser afectada por la desnervación preganglionar. La elevación de la $[\text{K}^+]_e$ provoca despolarización sin discriminar entre elementos pre o postganglionares, neuronales o gliales, no pudiéndose discernir la contribución relativa de cada uno en la respuesta al K^+ .

El objetivo del primer grupo de experimentos presentado en esta sección fue analizar si las fibras GABA inmunorreactivas que entran al GCS contribuyen a la liberación de ^3H -GABA que se desarrolla en respuesta a la elevación del K^+ externo. Para ello, se examinó la liberación de GABA en GCS de ratas a las que se practicó previamente una sección unilateral del TSC; el GCS contralateral de cada animal (con operación simulada) se utilizó como control. Por otra parte, a los fines comparativos, en experimentos similares se estudió, en ganglios desnervados y controles, la liberación de ^3H -ACh.

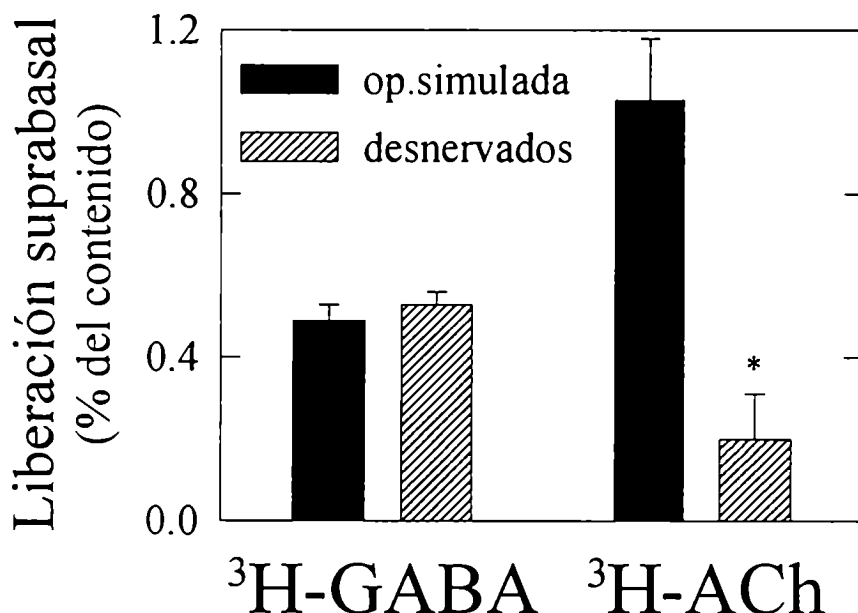


Figura 25. Efecto de la desnervación preganglionar crónica sobre la liberación de ^3H -GABA y ^3H -ACh evocada por K^+ en el GCS. GCS desnervados o con operación simulada se marcaron con ^3H según materiales y métodos. Se grafica (media \pm e.s. n = 5) la liberación por sobre el basal evocada por $[\text{K}^+]_e$ 50 mM. * = $P < 0.05$, test t de Student.

Como muestra la Figura 25, la liberación de ^3H -GABA evocada por $[\text{K}^+]_e$ 50 mM no fue diferente en ganglios con desnervación u operación simulada. La liberación de ^3H -ACh, en contraste, se redujo en un 80 % en los ganglios desnervados.

Se puede pensar entonces que a diferencia de la liberación de ACh, que es claramente dependiente de la presencia de terminales preganglionares, la liberación de GABA evocada por K^+ parece provenir principalmente de elementos no afectados por la desnervación, probablemente las células (glía y/o neuronas) que sintetizan y acumulan GABA localmente.

En una segunda serie de experimentos intentamos evaluar en qué grado contribuyen a la liberación de ^3H -GABA evocada por K^+ los compartimientos glial y neuronal previamente mencionados. Para ello se realizaron experimentos en los cuales la incubación con ^3H -GABA previa a la perfusión se realizó en presencia de los inhibidores selectivos del transporte glial ó neuronal del neurotransmisor y posteriormente se analizó la respuesta de la preparación a la elevación del K^+ externo. Cuando la preparación se incuba con ^3H -GABA en presencia de β -alanina ó 2,4-DABA se espera que el transmisor radioactivo se acumule preferentemente en el compartimiento insensible al efecto de cada droga.

En la Figura 26 se observa que cuando la incubación de marcación se hace en presencia de β -alanina (Fig. 26A2, Fig. 26B), posteriormente se desarrolla la

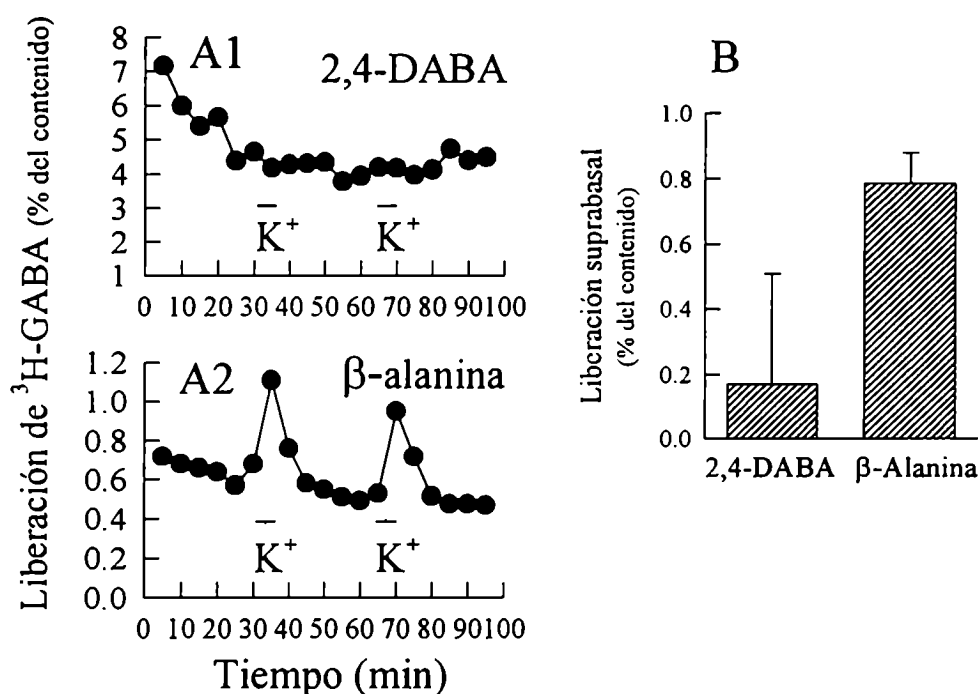


Figura 26. Efecto de la presencia de inhibidores del transporte durante la incubación con ^3H -GABA sobre la liberación inducida por K^+ 50 mM. Los GCS fueron marcados con ^3H -GABA de acuerdo a lo descrito en materiales y métodos pero en presencia de 2,4-DABA (A1) ó β -alanina (A2) ambos en concentración 0.5 mM. En (B) se muestra media \pm e.s.; 2,4-DABA: n = 7 estímulos en tres GCSs; β -alanina: n = 6 estímulos en 2 GCSs.

característica respuesta al K^+ 50 mM. Por el contrario, al realizar la incubación en presencia de 2,4-DABA fue difícil detectar una respuesta al K^+ (Fig. 26A1, Fig. 26B).

Estos resultados indican que el compartimiento insensible a β -alanina (presumiblemente neuronal) muestra una mayor sensibilidad para la liberación de 3H -GABA evocada por K^+ ; mientras, que al menos en estas condiciones experimentales, no pudo detectarse liberación evocada por K^+ desde el compartimiento 2,4-DABA-insensible (presumiblemente glial).

Esto sugiere posiblemente gran parte de la liberación de GABA evocada por alta $[K^+]_e$ provenga de neuronas, aunque lo mismo no sea válido para la captación o la liberación por intercambio heterólogo de este aminoácido.

Por otra parte, debido a que en estos experimentos los inhibidores de la captación estuvieron presentes sólo durante la incubación previa, estos resultados sugieren que durante la perfusión la recaptación del transmisor no contribuye significativamente al eflujo basal medido, y que por lo tanto el aumento en el eflujo observado en experimentos anteriores (sección 2.3) es principalmente debido a un mecanismo de intercambio heterólogo.

Acción de la veratrina, agonistas de receptores de neurotransmisores y estimulación eléctrica preganglionar.

Los resultados presentados hasta el momento indican que en el GCS tanto elementos gliales como neuronales participan en la acumulación de 3H -GABA, mientras que en la liberación evocada por aumento de la $[K^+]_e$ predominan o son más sensibles los elementos neuronales. Las células gliales son altamente permeables al K^+ y en general no expresan canales de Na^+ voltaje-dependientes en una densidad significativa excepto en el estadio embrionario o cultivadas in vitro (Barres 1991).

Las células gliales del GCS en ratas adultas, si bien se despolarizan fácilmente por K^+ , son electrofisiológicamente inexcitables (Adams y Brown, 1975; Bowery y col., 1979), lo cual sugiere que efectivamente no poseen canales de Na^+ voltaje dependientes. La veratridina es un alcaloide que provoca despolarización actuando sobre estos canales (Levi, y col., 1980; Hille, 1992) y es frecuentemente utilizada en experimentos neuroquímicos para evocar liberación de neurotransmisor (Levi y col., 1980; Adam-Vizi, 1992).

Si en el GCS existe un componente neuronal en la liberación de 3H -GABA, éste debería ponerse en evidencia por efecto de una droga como la veratridina. En los experimentos descritos a continuación ensayamos el efecto de la veratrina, una mezcla de alcaloides cuyo principio activo es la veratridina (ver materiales y métodos), aplicándola al medio de perfusión de ganglios que previamente habían acumulado 3H -GABA.

Los resultados graficados en la Figura 27 muestran que la veratrina es capaz de promover la liberación de 3H -GABA en forma dependiente de la concentración (Figura 26 A-C) siendo el efecto difícil de lavar o parcialmente irreversible a las concentraciones más altas probadas (Figura 27B,C). El efecto de la veratrina a baja concentración (10 μ g/ml) no fue alterado por la falta de Ca^{2+} extracelular, como se observa en la Figura 27D. Aunque no se puede descartar algún efecto no específico de la droga, en principio se puede concluir que a través de la despolarización sostenida de células que poseen canales de Na^+ voltaje-dependientes esta droga causa principalmente un aumento de la liberación Ca^{2+} -independiente,

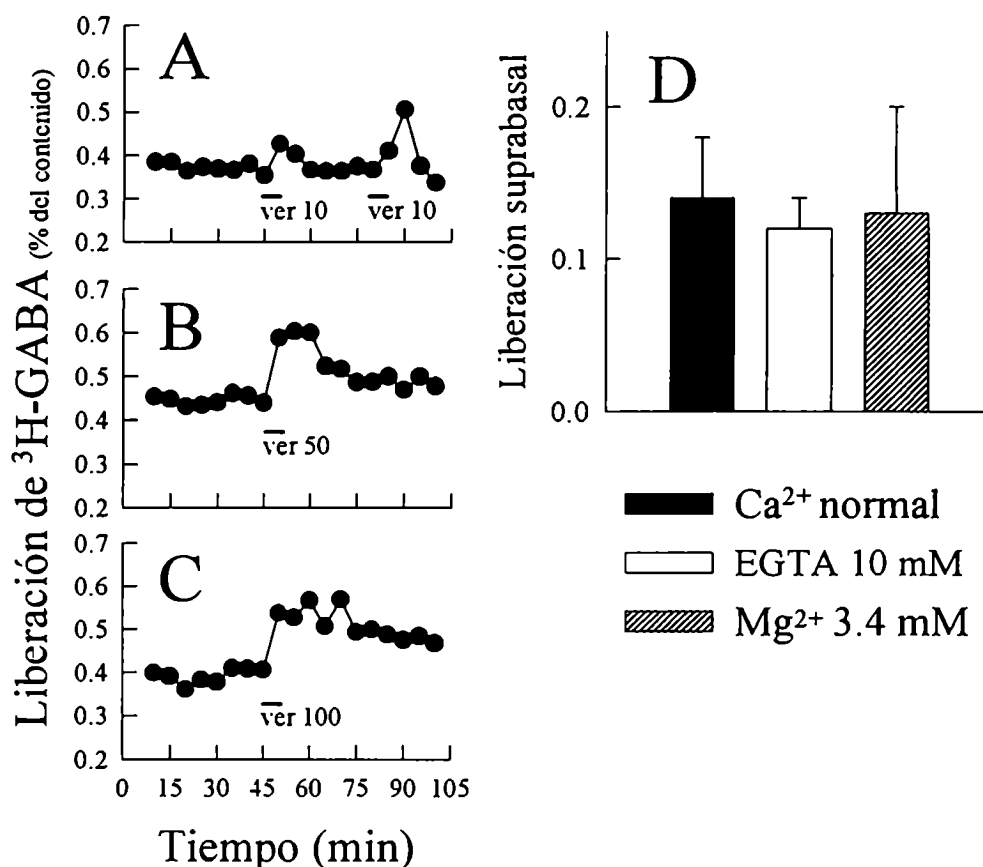


Figura 27. Efecto de la veratrina sobre la liberación de ³H-GABA en el GCS. De acuerdo a lo indicado por las barras bajo los punto se aplicó veratrina 10, 50 y 100 µg/ml para A, B y C respectivamente. En D se muestra (media ± e.s. n = 4 aplicaciones 2 GCS) el efecto de la droga (10 µg/ml) en condiciones de bajo Ca²⁺.

mediada por transportador, tal como se ha discutido previamente (Levi y col., 1980; Sihra y col., 1984).

En el SNC, la liberación de GABA es fundamentalmente estimulada por glutamato (Nicoll y col., 1990; Attwell y col., 1993; Belhage y col., 1993) que excita a las neuronas GABAérgicas, e inhibida por el GABA mismo (Nicoll y col., 1990; Davies y Collingridge, 1993; Mody y col., 1994) actuando sobre autorreceptores. Para tratar de identificar posibles moduladores de la liberación de GABA en el GCS, realizamos la serie de experimentos descriptos a continuación.

Se analizó el efecto de la aplicación de agonistas y antagonistas de receptores de ACh (nicotina, muscarina, d-tubocurarina, atropina) y de GABA (muscimol, agonista GABA_A y baclofen, agonista GABA_B). Se estudió también el efecto de agonistas de receptores de distintas sustancias que pueden actuar como neurotransmisores o neuromoduladores locales en el GCS: dopamina, norepinefrina, serotonina, histamina y glutamato. Todos ellos se sintetizan

en el ganglio y ejercen efectos mediados por receptores específicos (Kafka y Thoa, 1979; Araujo y Collier, 1986; Christian y col., 1989; Field y Newberry, 1991; Zhang y col., 1991; Christian y Weinreich, 1992; Elfvin y col., 1993; Zhang y col., 1993a,b; Alkadhi y col., 1994; Takenaka y col. 1994), con excepción del glutamato que se sintetiza en el GCS pero para el cual no se han descrito hasta el momento efectos mediados por receptor.

También se estudió la actividad de las hormonas producidas por dos glándulas endocrinas que reciben inervación simpática desde el GCS: la hormona tiroidea tiroxina (T4) que es una señal hormonal con actividad moduladora de la transmisión ganglionar (Landa 1991) y la melatonina, hormona pineal que en el SNC modula la transmisión GABAérgica (Rosenstein y Cardinali 1990) y que se presume afecta la transmisión ganglionar simpática en ganglios fuera de la región cervical (Carneiro y col., 1994).

En la Figura 28 se grafican, para ejemplificar los diseños experimentales, los resultados de dos experimentos elegidos arbitrariamente. En el experimento de la Figura 28A se examinó el efecto de la norepinefrina (10 y 100 μM) aplicada al medio de perfusión por períodos de 5 min y finalmente se aplicó solución de $[\text{K}^+]_e$ 20 mM. En este tipo de experimentos ninguna de las drogas utilizadas modificó la liberación basal de ^3H -GABA.

La Figura 28B muestra los resultados de un experimento en el cual se realizaron cuatro aplicaciones sucesivas de $[\text{K}^+]_e$ 20 mM, la segunda y la cuarta en presencia de nicotina (10 y 100 μM). La droga se aplicó 10 min antes y durante la estimulación con K^+ elevado y como puede verse no afectó la liberación basal (fracciones previas al K^+) ni la suprabasal evocada por K^+ .

Ninguno de los compuestos ensayados (Nicotina [#] 10 μM n = 12, 100 μM n = 4 ; Muscarina 10 μM n = 3, 100 μM n = 1; Carbacol 10 μM n = 6, 100 μM n = 2; tubocurarina 10 μM n = 2; atropina 10 μM n = 2; Muscimol 10 μM n = 6, Baclofen 10 μM n = 6, Norepinefrina 10 μM n = 6, 100 μM n = 4; Dopamina 10 μM n = 6, 100 μM n = 4; Serotonina 10 μM n = 6, 100 μM n = 4; Histamina 10 μM n = 3; Glutamato 10 μM n = 2, 100 μM n = 1; NMDA 10 μM n = 2, 100 μM n = 1; Melatonina 1 μM n = 8, 0.1 μM n = 2; T4 1 μM n = 8) fue capaz, por sí mismo, de producir liberación suprabasal ni de disminuir el eflujo basal de ^3H -GABA.

Los resultados expuestos en la Tabla 4 muestran que, en los casos probados, tampoco se observó ninguna modificación de la liberación suprabasal evocada por $[\text{K}^+]_e$ 20 mM. Obtuvimos resultados básicamente idénticos (no mostrados) al analizar la respuesta al $[\text{K}^+]_e$ 30 ó 50 mM; o cuando el tejido se expuso a K^+ 50 mM por 15 min antes de la incubación con ^3H -GABA (ver materiales y métodos), tratamiento que por provocar depleción de al menos una parte del GABA endógeno, podría aumentar la incorporación de ^3H -GABA al compartimiento liberable y como consecuencia mejorar la sensibilidad del sistema experimental.

[#]: la nicotina estimuló la liberación de GABA en 2 de 12 aplicaciones, por lo que este efecto "marginal" no fue considerado.

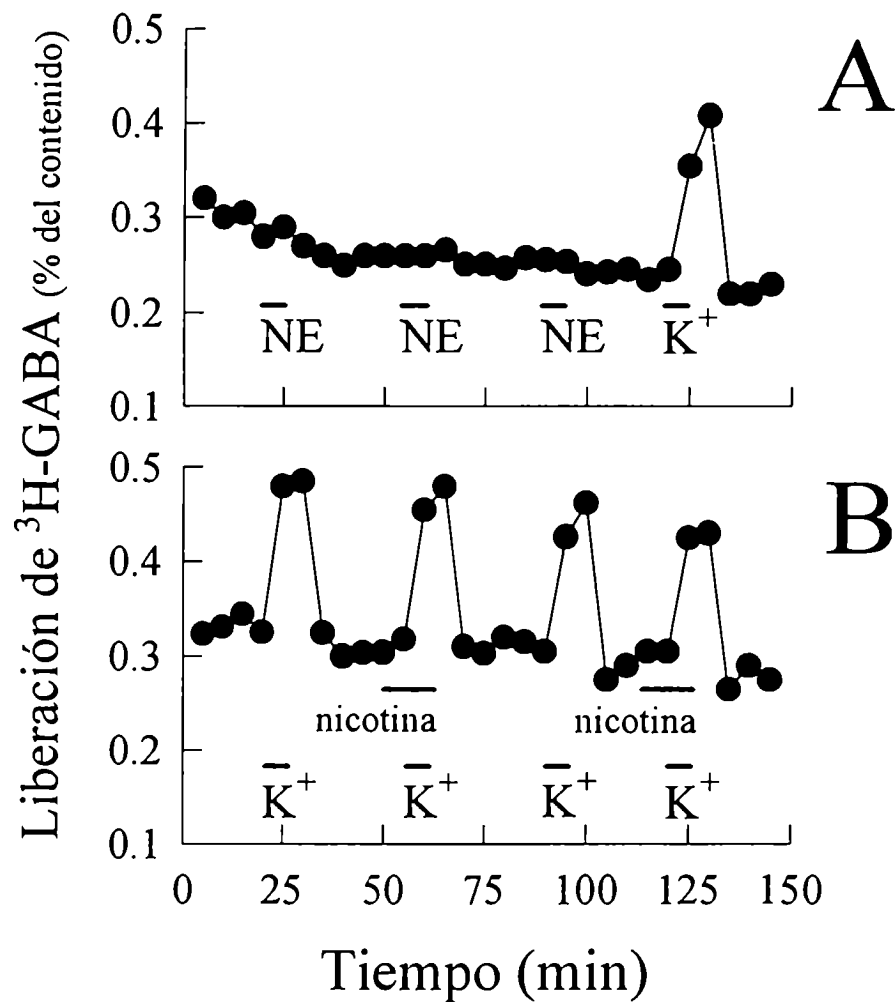


Figura 28. Efecto de posibles moduladores de la liberación de GABA en el GCS. Se muestran dos experimentos representativos donde se estudió el efecto de las sustancias sobre la liberación basal y la estimulada por K^+ . Las drogas se aplicaron según lo indicado por las barras bajo los puntos.

La actividad de los terminales preganglionares es sin duda la principal señal de entrada aferente al GCS. Debido a que la ACh es el principal (si no el único) transmisor que se libera desde dichos terminales quisimos evaluar, desde dos aproximaciones distintas y adicionales al simple uso de agonistas, la posibilidad de que la ACh pueda evocar la liberación de GABA en el GCS.

Tabla 4. Efecto de distintos agonistas sobre la liberación de ^3H -GABA evocada por K^+ 20 mM en el GCS

grupo experimental	liberación suprabasal evocada por K^+ 20 mM
control	0.23 ± 0.01
nicotina 10 μM	0.18 ± 0.03
muscarina 10 μM	0.26 ± 0.06
carbacol 10 μM	0.24 ± 0.02
baclofen 10 μM	0.21 ± 0.03
muscimol 10 μM	0.22 ± 0.05
dopamina 10 μM	0.27 ± 0.03
norepinefrina 10 μM	0.21 ± 0.02
glutamato 10 μM	0.25 ± 0.06
NMDA 10 μM	0.22 ± 0.09
histamina 10 μM	0.25 ± 0.03
serotonina 10 μM	0.22 ± 0.03
melatonina 100 nM	0.24 ± 0.038
tiroxina 10 nM	0.23 ± 0.07

Los GCS fueron marcados con ^3H -GABA de acuerdo a lo descrito en materiales y métodos. Los agonistas fueron agregados al medio de perfusión 10 min antes y durante la perfusión con K^+ 20 mM. Melatonina y tiroxina se agregaron 25 min antes y junto con el K^+ alto. Se muestra la media \pm e.s. n entre 2 y 7.

En primer lugar, analizamos la respuesta a agonistas colinérgicos en ganglios sometidos a desnervación preganglionar crónica. Asumiendo que ante la falta de inervación presináptica, las células postsinápticas desarrollan comunmente supersensibilidad por aumento del número de receptores. Este fenómeno está muy bien descrito en las sinapsis nicotínicas de la unión neuromuscular (Axelson y Thesleff, 1959), que tienen cierta analogía con las sinapsis de los ganglios simpáticos. Sin embargo, la extrapolación de esas observaciones a estas últimas es discutible (Volle, 1980b). Algunos resultados muestran que frente a la desnervación la sensibilidad de las neuronas postganglionares no cambia o incluso disminuye, (Volle, 1980b)

sugiriendo que la actividad aferente fuera necesaria para la expresión de receptores nicotínicos neuronales en la postsinapsis.

En la Figura 29 puede verse que en ganglios con desnervación crónica, igual que en los controles con operación simulada, no se modifica la liberación basal de GABA por aplicación de nicotina (10 μ M), así como tampoco se modifica la respuesta al $[K^+]_e$ 20 mM. Resultados similares (no mostrados) se obtuvieron por aplicación de muscarina (10 μ M, n = 2) ó carbacol (10 μ M, n = 1).

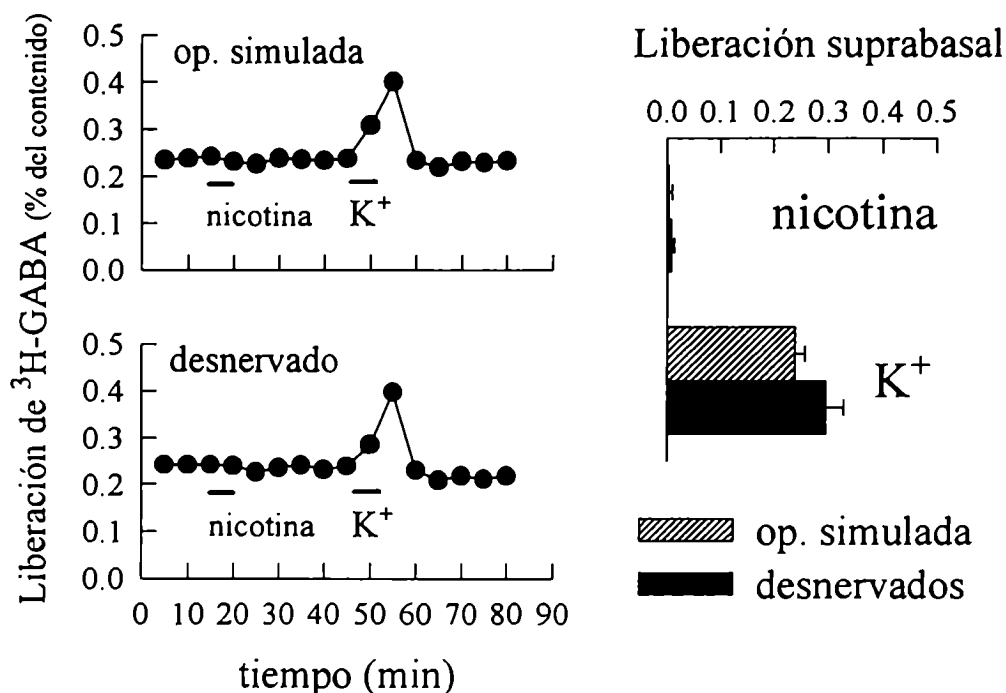


Figura 29. Efecto de la desnervación preganglionar crónica sobre la acción de la nicotina y el K^+ 20 mM. Izquierda: experimento representativo, GCS con operación simulada y contralaterales desnervados. Derecha resumen de 4 experimentos, media \pm e.s.

En segundo lugar, evaluamos el efecto de la estimulación eléctrica del nervio preganglionar sobre el eflujo de $^3\text{H-GABA}$. Para ello, tras incubar la preparación en presencia de GABA tritiado se lo perfundió en forma continua, y se aplicaron pulsos cuadrados (0.5 msec de duración) de voltaje (supramáximo) al tronco simpático cervical. La efectividad de la estimulación eléctrica se verificó mediante el registro del potencial de acción compuesto en el nervio postganglionar (ver Materiales y Métodos).

La estimulación eléctrica fue muy poco eficiente para modificar el eflujo de radioactividad colectada en fracciones de 5 min: sólo en 2 de 7 intentos (en tres preparaciones independientes) la aplicación de estímulos a 5 Hz durante 5 min produjo un leve incremento del eflujo de $^3\text{H-GABA}$ por sobre el basal (resultados no mostrados). Los resultados mostraron una falta de reproducibilidad que no permitió analizar (por ejemplo a través de la farmacología)

si la ACh u otro mediador cuya liberación pudiera evocarse por estimulación preganglionar son realmente capaces de producir liberación de $^3\text{H-GABA}$.

En resumen, de acuerdo con nuestros resultados la única manipulación experimental que produce claramente liberación de GABA en este ganglio simpático es el aumento de la $[\text{K}^+]_e$. Aunque la posibilidad no se puede descartar por completo, en principio los resultados obtenidos no muestran que la ACh, el transmisor excitatorio principal a nivel ganglionar, pueda actuar estimulando la liberación de GABA. La posibilidad de que alguno de los numerosos péptidos identificados en el GCS (Kessler y Black 1982; Elfvin y col., 1993) y que se almacenan entre otros sitios en los terminales preganglionares (Dagerlind y col., 1994), puedan desarrollar tal efecto no fue analizada en este trabajo de Tesis.

Parte 2: Efectos del GABA sobre la transmisión ganglionar

En esta parte se presentan y discuten los resultados de experimentos diseñados para evaluar algunos aspectos de la función "postsináptica" del GABA en el GCS. En primer lugar se discuten brevemente experimentos realizados mediante técnicas de neuroquímica; posteriormente se describen los resultados obtenidos mediante técnicas electrofisiológicas de registro extracelular.

2.1. Efecto del GABA sobre la transmisión ganglionar.

Efecto del GABA sobre el influjo de $^{36}\text{Cl}^-$ en células dispersas.

Hemos mencionado en la Introducción que, previamente a este trabajo, habían sido descritas algunas acciones del GABA en el GCS. En particular se sugirió que algunas de ellas están mediadas por receptores tipo GABA_A , dado que se reducen en presencia de picrotoxina (Bowery y Brown, 1974), un bloqueante del canal de Cl^- asociado a dicho receptor o de bicuculina (Bowery y Brown, 1974) un antagonista competitivo de la acción del GABA sobre estos receptores.

Una metodología neuroquímica ampliamente utilizada para estudiar el efecto del GABA sobre los receptores GABA_A en el SNC, es analizar el influjo de $^{36}\text{Cl}^-$ activado por GABA, usualmente en preparaciones tales como los sinaptoneurosomas (Harris y Allan, 1985). En el GCS, este tipo de experimento no ha sido nunca reportado en la bibliografía, posiblemente por la dificultad que se encuentra para obtener preparaciones de ese tipo partiendo del tejido de ganglio simpático (Wilson y Cooper, 1972).

Para evaluar la posibilidad de utilizar este tipo de método intentamos ensayar la técnica del influjo de $^{36}\text{Cl}^-$ en células dispersas obtenidas por tratamiento del GCS con un "cocktail" enzimático (tripsina, colagenasa y DNAsa) de acuerdo con un protocolo frecuentemente utilizado (Cull Candy y col., 1986).

Como puede verse en la Figura 30, la incorporación de $^{36}\text{Cl}^-$ por células expuestas durante 5 segundos a una solución externa conteniendo el isótopo ($0.25 \mu\text{Ci}/\text{tubo}$) con o sin GABA ($100 \mu\text{M}$) fue estadísticamente indistinguible, con cierta tendencia a una mayor incorporación de $^{36}\text{Cl}^-$ en ausencia de GABA. Este resultado fue obtenido en forma sistemática con la preparación de células, independientemente de que se observara un aumento del influjo de $^{36}\text{Cl}^-$ activado por GABA $100 \mu\text{M}$ a sinaptoneurosomas de corteza cerebral (Figura 30) en experimentos realizados en paralelo como control grosero de las condiciones experimentales.

Estos resultados muestran que estudiar la función del GABA mediante esta técnica es, por lo menos, difícil en esta preparación. Posiblemente esto se deba a la relación entre el potencial de membrana y el potencial de equilibrio del Cl^- . En el GCS in vitro, distintas neuronas se hiperpolarizan o despolarizan en respuesta al GABA aunque las que se despolarizan son aparentemente las más frecuentes (Adams y Brown, 1975). Si esto fuese así, ante la activación de los receptores GABA_A debería producirse un eflujo neto de Cl^- , dificultando la detección del influjo del ión radioactivo. Una posibilidad, no probada en este trabajo de tesis, sería "cargar" las células con $^{36}\text{Cl}^-$ y analizar posteriormente el eflujo de radioactividad.

No se puede descartar que el tratamiento enzimático tenga algún efecto deletéreo sobre los receptores GABA_A , sin embargo las neuronas del GCS obtenidas de esta manera expresan corrientes de Cl^- activadas por GABA y bloqueables por picrotoxina (Cull Candy y col., 1986; Smart y col., 1990; Newland y col., 1991; Newland y Cull-Candy 1992).

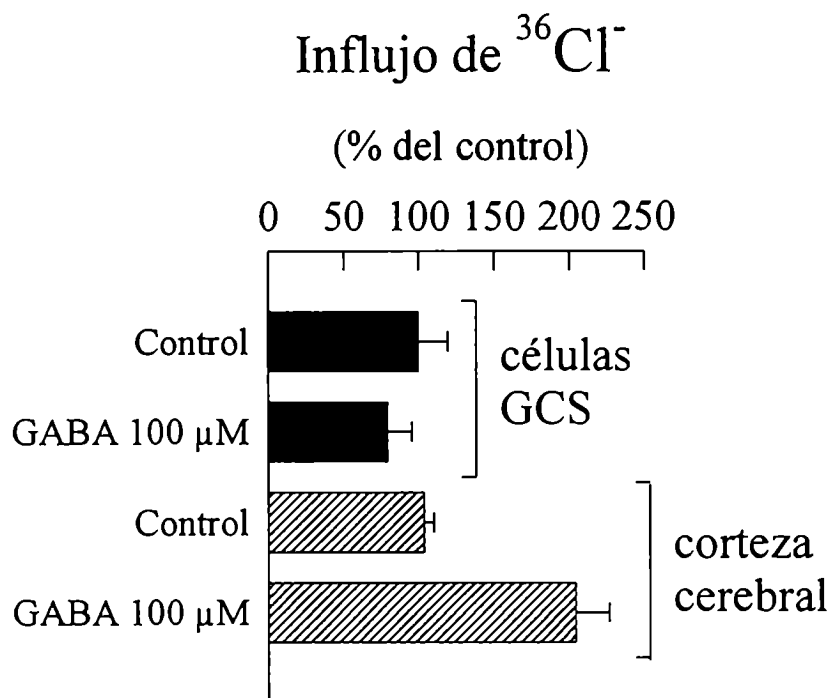


Figura 30. Efecto del GABA sobre el flujo de Cl^- en células dispersas de GCS. Se aplicó GABA 100 μM por 5 seg junto con el $^{36}\text{Cl}^-$. Se usaron sinaptoneurosomas de corteza cerebral de hamster dorado como control general de las condiciones de ensayo. Se muestran media \pm e.s., $n = 3$.

Efecto del GABA sobre la transmisión.

La posibilidad de que el GABA tuviera algún rol funcional en los ganglios simpáticos y en el GCS en particular fue por lo usual negada (Bowery y Hill, 1986). Esto fue así pese a que como mencionamos, se describían efectos desarrollados por el aminoácido tales como inhibición de la liberación de ACh (Brown y Higgins, 1979; Farkas y col., 1986) y la despolarización ganglionar (de Groat, 1970; Bowery y Brown, 1974). La despolarización ganglionar inducida por GABA es la acción que ha sido más y mejor estudiada en el GCS, utilizando un electrodo de superficie colocado sobre el cuerpo del ganglio (de Groat, 1970; Bowery y Brown, 1974; Schlosser y Franco 1979; Little, 1984). La respuesta se mide frente al agregado de GABA exógeno o agonistas y en ausencia de estimulación eléctrica (Bowery y Brown, 1974). Esta acción despolarizante llevó a algunos investigadores a postular que el GABA tuviera un efecto excitatorio en el GCS (Kenny y Ariano, 1986, Happolla y col., 1987) hecho que se contradice con el efecto inhibitorio sobre la presinapsis o sugiere un efecto dual (Happolla y col., 1987).

Para estudiar el efecto del GABA sobre la transmisión sináptica del impulso nervioso en el GCS, utilizamos una metodología de registro extracelular que permite estudiar la respuesta originada sinápticamente en el nervio postganglionar por la estimulación eléctrica del

nervio preganglionar. La amplitud de esta señal extracelular, denominada Potencial de Acción Compuesto (PAC, Junge, 1992b) es directamente proporcional al número de axones que disparan potencial de acción en el nervio, y en el caso del nervio postganglionar corresponde al número de neuronas postganglionares reclutadas sinápticamente tras la estimulación preganglionar (Brown y Mc Afee, 1982).

El primer tipo de experimentos realizados para estudiar el rol del GABA en el GCS in vitro, consistió en analizar su efecto aplicándolo al medio de perfusión y estimulando el nervio preganglionar a una frecuencia de 0.016 ó 0.033 Hz con pulsos cuadrados de voltaje de 0.5 mseg de duración.

En la Figura 31 se muestran registros superpuestos obtenidos en el nervio carotídeo interno (NCI) antes, durante y después de una perfusión de 60 seg con GABA 25 μ M en un experimento representativo. La presencia del aminoácido en el medio de

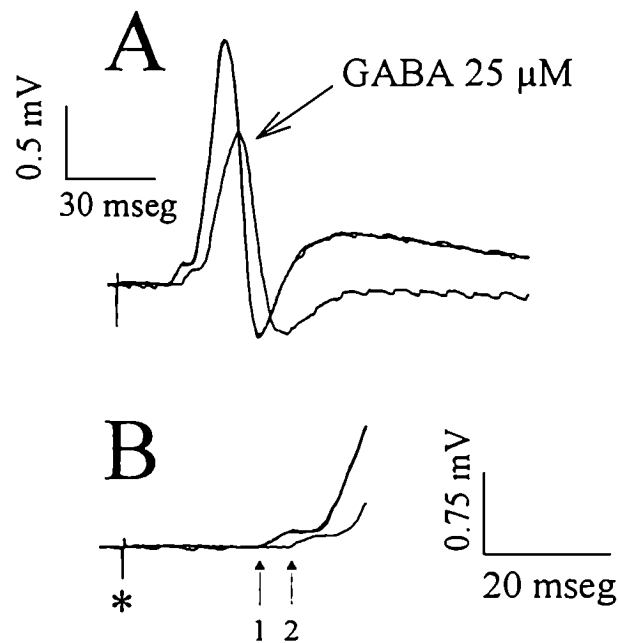


Figura 31. Efecto del GABA sobre la transmisión ganglionar. (A) Se muestran tres registros superpuestos obtenidos en el NCI antes durante y 10 min después de la aplicación de GABA (25 μ M) (B) En los mismos registros de (A) se señala la latencia entre el artefacto de la estimulación (asterisco) y el inicio de la señal (flechas) 1: antes y después del efecto del GABA. 2: durante la perfusión con GABA 25 μ M.

perfusión produce, en forma reversible, un efecto inhibitorio neto de la transmisión que se puede observar como una disminución de la amplitud (Fig. 31A) y un aumento tanto de la

latencia (Fig. 31B) como del tiempo al pico de la señal. La duración de la deflexión inicial en cambio, no se modificó significativamente.

En la Figura 32 se muestra el curso temporal de la amplitud, la latencia y el tiempo al pico de la señal registrada en el NCI en dos experimentos representativos en los que se perfundi6 durante 60 seg con GABA 25 y 100 μM . La amplitud del PAC fue aparentemente el parámetro mas sensible al efecto inhibitorio del GABA ex6geno, por lo cual fue utilizada como indicador de la acci6n del neurotransmisor en todos los experimentos siguientes (ver secci6n materiales y m6todos). El efecto inhibitorio por perfusiones de 60 seg se revirti6 por lavado en 5 a 10 min y s6lo ocasionalmente se prolong6 mas all6 de ese valor (m6ximo 20 min).

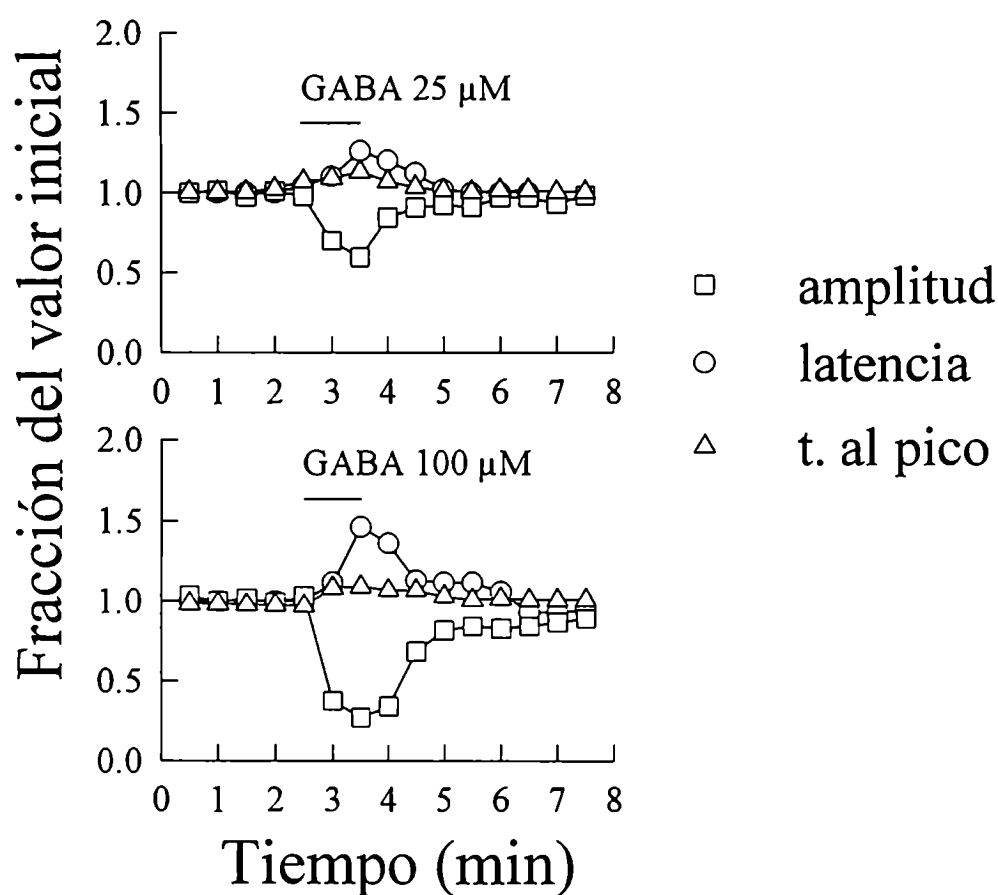


Figura 32. Efecto de la perfusi6n por 60 seg con GABA sobre tres par6metros de la se6al registrada en el NCI. La amplitud, la latencia entre el artefacto de estimulaci6n y el inicio de la se6al (ver figura 31) y el tiempo entre el artefacto y el pico de la deflexi6n inicial (t. al pico). Frecuencia de estimulaci6n 0.033 Hz, intensidad supram6xima

Los resultados presentados hasta aqu6 sugieren que el GABA inhibe la transmisi6n excitatoria en el GCS, en coincidencia con resultados obtenidos previamente por otros grupos utilizando metodolog6as de registro diferentes a la nuestra (de Groat, 1970; Bowery y Brown 1974; Adams y Brown, 1975). Los experimentos descriptos a continuaci6n fueron realizados

para determinar si la inhibición de la transmisión por aplicación de GABA exógeno al GCS es un efecto mediado por receptores específicos.

En primer lugar intentamos determinar si este efecto del GABA sigue una relación concentración-respuesta compatible con el modelo clásico para un efecto desarrollado por la interacción del ligando con un número finito y saturable de receptores que medien la acción (Ross, 1990). En segundo lugar utilizamos agonistas y antagonistas farmacológicos clásicos de los receptores que median los efectos del GABA en otras regiones del sistema nervioso.

Como la perfusión de 60 seg usada en los experimentos presentados hasta aquí es probablemente demasiado breve para que se alcance una concentración homogénea de GABA en la cámara de registro antes del comienzo del lavado, ensayamos el efecto de perfusiones de mayor duración, asumiendo que éstas permitan alcanzar una concentración efectiva de GABA idealmente igual a su concentración en la solución con que se perfunde y optimizar así el análisis concentración-respuesta.

Como se observa en la Figura 33A, durante perfusiones de 5 min con GABA 25 μM (o menor) se alcanza un efecto inhibitorio, en general en los primeros 30 a 90 seg, que se mantiene durante el resto de la perfusión. A una concentración mayor (250 μM), en contraste, luego de alcanzar un valor máximo tras el comienzo de la perfusión, el efecto disminuye pese a la presencia continua de la droga en la solución externa (Figura 33B). El efecto máximo siempre se obtuvo entre los 30-90 seg iniciales, pero usualmente, se observó a los 60 seg. Para una misma concentración de GABA, el efecto máximo alcanzado con perfusiones de 1 ó 5 min fue aproximadamente similar.

Es posible que la atenuación del efecto del GABA observada durante perfusiones sostenidas con concentraciones relativamente altas sea la expresión macroscópica del fenómeno de desensibilización de los receptores GABA_A (Macdonald y Olsen, 1994; Bormann, 1988), que ha sido descrita a concentraciones altas de GABA en las neuronas postganglionares disociadas del GCS (Newland y col., 1991).

Alternativamente, dado que en esta preparación existen mecanismos activos de transporte de GABA (que han sido estudiados en este trabajo de Tesis), la atenuación del efecto podría deberse a que el aminoácido sea captado hacia compartimientos intraganglionares por medio de los sistemas de transporte, disminuyendo su concentración efectiva.

De acuerdo con los resultados obtenidos en esta Tesis, a una $[\text{GABA}] = 250 \mu\text{M}$ el sistema de transporte de alta afinidad ($Km_a = 22 \mu\text{M}$) se encuentra saturado; mientras que el de baja afinidad ($Km_b = 195 \mu\text{M}$) se encuentra cercano al Km . Teniendo en cuenta estos datos se puede estimar la masa de GABA removible por recaptación y por lo tanto la incidencia que puede tener el transporte sobre la concentración extracelular de GABA. Para un ganglio de 2 mg y asumiendo que la velocidad total de transporte sea constante e igual a la suma de la de cada sistema, la velocidad total de transporte sería: $v_t \cong 300 \text{ pmol/min}$, es decir que en 5 min pueden ser removidos unos 2 nmoles de GABA del medio extracelular. Esto reduciría la concentración de GABA desde 500 a 496 μM ó de 250 a 246 μM , cambio que probablemente no sea suficiente como para justificar la reducción observada en el efecto (Figura 33B).

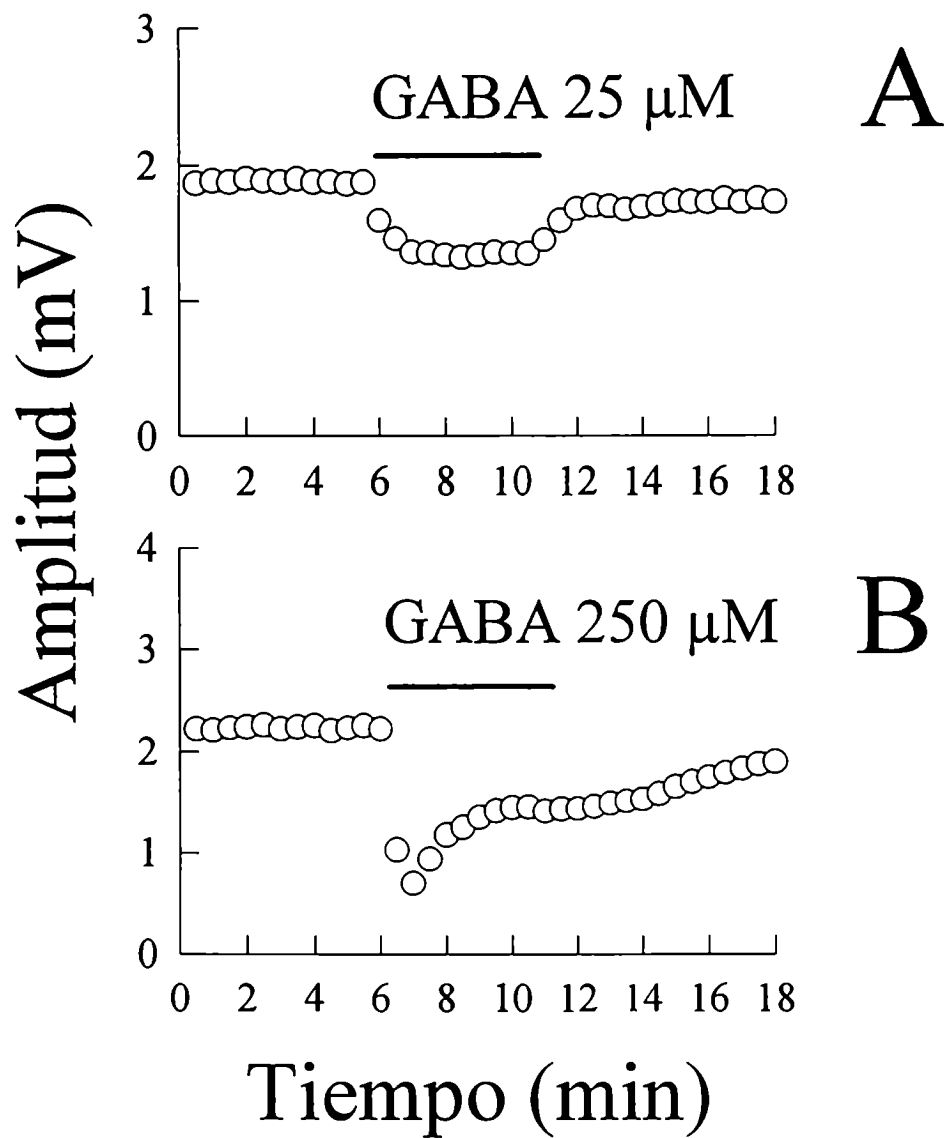


Figura 33. Efecto de la perfusión prolongada (5 min) con GABA a dos concentraciones, sobre la amplitud del PAC registrado en el NCI. Frecuencia de estimulación 0.033 Hz, intensidad supramáxima. (A) A concentración 25 μM el efecto inhibitorio del GABA se mantiene durante toda la perfusión; (B) con GABA 250 μM se alcanza un efecto máximo entre los 30 y 90 seg de iniciada la perfusión; el efecto disminuye aun en presencia del GABA y luego desaparece por lavado.

Aunque la posibilidad no se puede descartar, consideramos entonces poco probable que la captación sea causa de la atenuación observada y que este efecto sea principalmente debido a la desensibilización. Conclusiones similares fueron sugeridas por otros investigadores para la despolarización ganglionar inducida por GABA, cuya atenuación persiste aunque el transporte esté inhibido farmacológicamente (Bowery y Brown, 1974; Adams, 1975).

Asumiendo que en función de la duración de la perfusión con GABA existe una relación de compromiso entre alcanzar la concentración efectiva máxima y provocar la desensibilización de la respuesta, procedimos a construir las curvas concentración-respuesta usando perfusiones de 60 seg con concentraciones crecientes aplicadas a una misma preparación con 30 min de separación.

En la Figura 34 se puede ver que el efecto inhibitorio de la transmisión se detecta a partir de una concentración 5 μM y aumenta en forma dependiente de la concentración de GABA en la solución de perfusión. En experimentos independientes al anterior, la aplicación de GABA 250 μM no tuvo efecto significativo sobre una aplicación subsiguiente de la misma concentración 30 min después (resultados no mostrados), sugiriendo que la perfusión por 60 seg con GABA 250 μM no produce desensibilización o que el efecto de esta última se ha revertido a los 30 min.

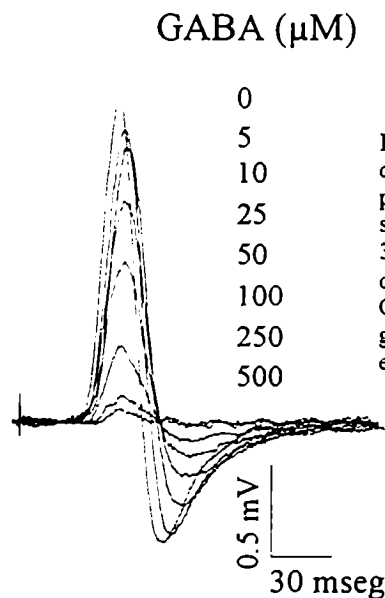


Figura 34. Dependencia con la concentración del efecto inhibitorio de la transmisión desarrollado por GABA. El GABA se aplicó en perfusiones de 60 seg a una misma preparación, separadas entre sí por 30 min de lavado. Se indican las concentraciones de GABA en el medio de perfusión. El efecto del GABA se examinó durante la estimulación pre-ganglionar supramáxima a 0.017 Hz, se muestra el efecto máximo observado en cada caso.

Teniendo en cuenta el máximo efecto inhibitorio observado (en más del 80 % de los casos a los 60 seg) se calculó para cada concentración el porcentaje de inhibición de la transmisión de acuerdo con lo descrito en materiales y métodos. Los resultados obtenidos se grafican en la Figura 35, pudiéndose ver que la inhibición de la transmisión por GABA sigue con la concentración la relación característica de un efecto mediado por receptor. Después de ajustar una curva sigmoidea a los datos de la Figura 35 se calculó la concentración de GABA en el medio de perfusión que produce el 50 % del efecto máximo, $[\text{GABA}]_{50} = 40 \pm 2 \mu\text{M}$. Esta $[\text{GABA}]_{50}$ es aproximadamente similar a la calculada para la despolarización ganglionar

inducida por GABA (Bowery y Brown, 1974) o para la activación por GABA de una corriente de Cl^- en neuronas postganglionares disociadas (Aguayo y col., 1993).

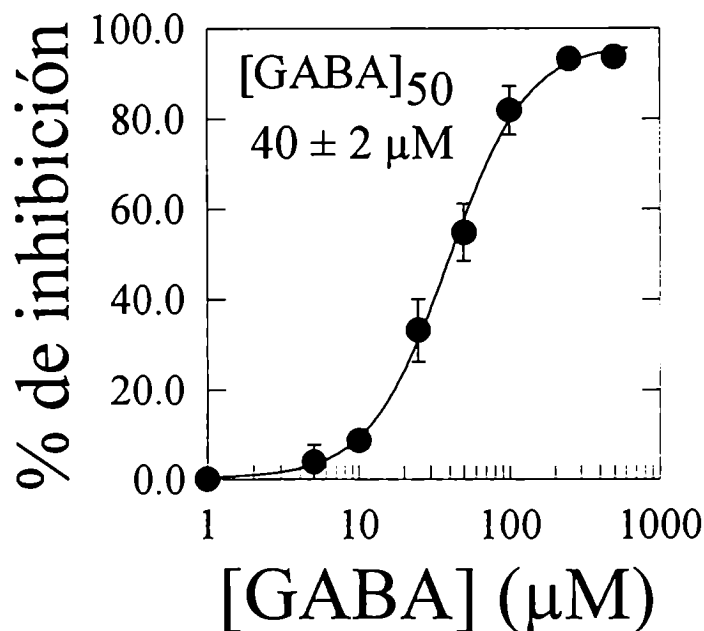


Figura 35. Curva concentración-efecto para el bloqueo de la transmisión por GABA. Se grafica el bloqueo máximo desarrollado por perfusiones de 60 seg separadas por 30 min de lavado durante estimulación supramáxima a 0.017 Hz. Se muestran medias \pm e.s., $n = 3$. se ajustó a los datos una curva sigmoidea $r = 0.998$. (Ecuación logística: $I \% = E_{\text{max}}([GABA]^n / ([GABA]^n + [I_{50}]^n))$). E_{max} = efecto máximo.

Farmacología

Para determinar si la inhibición de la transmisión por GABA está mediada por alguno de los receptores clásicos que median la acción de este neurotransmisor en el SNC, procedimos a evaluar el efecto de agonistas y antagonistas farmacológicos de los receptores GABA_A y GABA_B .

Uno de los agonistas con actividad sobre los receptores GABA_A más utilizado es el muscimol. Esta droga se une específicamente a estos receptores en el SNC (Bormann, 1988; Bowery, 1993; Macdonald y Olsen, 1994) y reproduce el efecto del GABA inclusive con mayor potencia, hecho posiblemente debido a que se une con mayor afinidad. Recientemente se ha descrito mediante autorradiografía cuantitativa y en membranas la presencia de sitios de unión para muscimol en el GCS de rata (Bowery y col., 1979; Amenta y col., 1992).

En la Figura 36 se observa el efecto de una perfusión con muscimol sobre la transmisión ganglionar registrando el potencial de acción compuesto en el NCI. En forma similar al GABA, el muscimol (20 μM) inhibe la transmisión excitatoria en forma reversible como lo muestran los registros de la Fig. 36A obtenidos antes, durante el máximo efecto y después del lavado de la droga. En la Figura 36B se grafica la amplitud del PAC en función del

tiempo y se puede observar que el efecto es reversible, aunque el tiempo de lavado requerido es en general algo mayor que para el GABA.

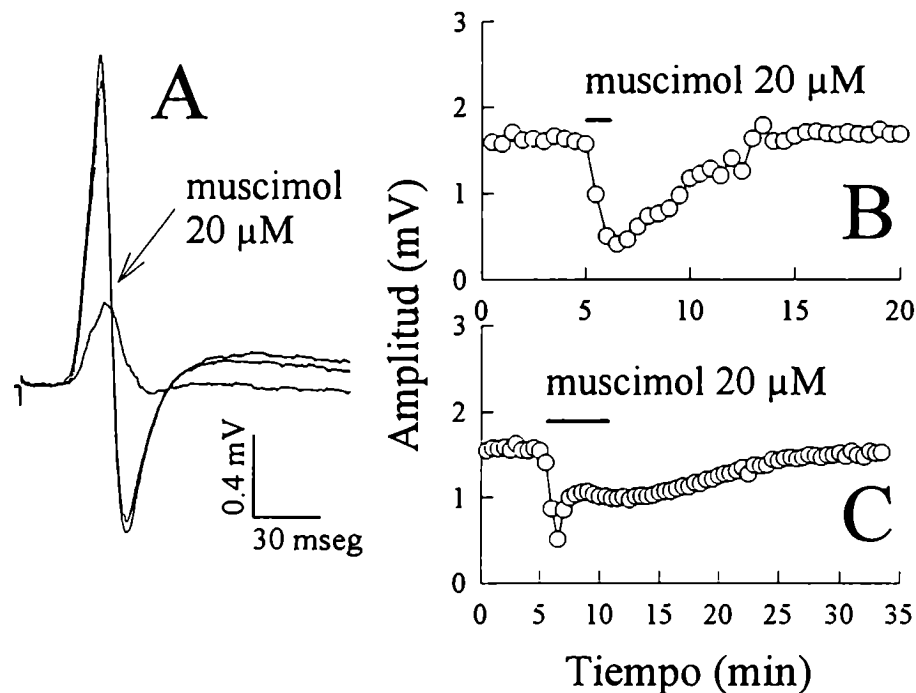


Figura 36. Efecto del agonista GABA_A muscimol sobre la transmisión ganglionar. (A) registros de un experimento representativo obtenidos antes, durante el efecto máximo (flecha) y después de la perfusión con muscimol 20 μM. (B) Curso temporal del bloqueo de la transmisión por perfusión de 60 seg con muscimol 20 μM; (C) Curso temporal del bloqueo por una perfusión de 5 min con muscimol 20 μM.

El efecto inhibitorio del muscimol también presenta atenuación pero ésta es detectable a concentraciones más bajas que por perfusiones con GABA, como se observa en la Fig. 36C, donde se muestran los cambios en la amplitud del potencial de acción compuesto en función del tiempo durante una perfusión de 5 min con muscimol 20 μM. A concentraciones similares, en contraste, el GABA no exhibe esta disminución del efecto. Dado que el muscimol no es transportado por los sistemas de captación de GABA (MacVicar y col., 1989) es probable que en este caso la atenuación se deba exclusivamente a la desensibilización de los receptores GABA_A.

Se construyeron curvas concentración-respuesta para muscimol usando perfusiones de 60 seg con concentraciones crecientes separadas por 30 min de lavado. Los resultados obtenidos se grafican en la Figura 37; el efecto máximo es estadísticamente indistinguible ($P > 0.05$) del obtenido con GABA, la curva concentración-respuesta ajustada a los datos de muscimol está desplazada hacia la izquierda respecto a la de GABA indicando una mayor potencia, lo cual se refleja en una $CE_{50} = 9 \pm 3 \mu M$.

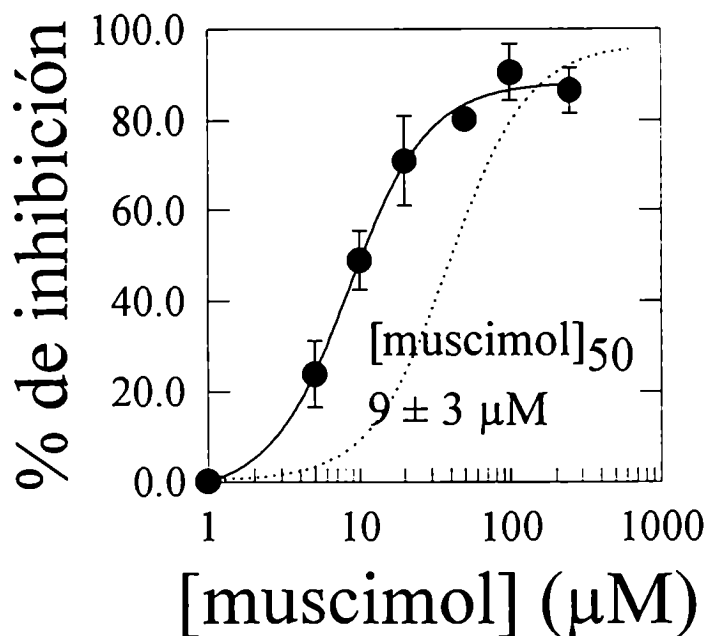


Figura 37. Curva concentración-efecto para el bloqueo de la transmisión por muscimol. Se grafica el bloqueo máximo desarrollado por perfusiones de 60 seg separadas por 30 min de lavado durante estimulación supramáxima a 0.017 Hz. Se muestran medias \pm e.s., $n = 3$. se ajustó a los datos una curva sigmoidea $r = 0.996$. (Ecuación logística: $I \% = E_{max}([muscimol]^n)/([muscimol]^n + [CI_{50}]^n)$). E_{max} = efecto máximo. En línea de puntos se muestra la curva ajustada a los datos obtenidos con GABA (ver Fig. 35).

El agonista de receptores $GABA_B$ por excelencia es el baclofen (Bowery, 1993). Aunque está muy bien caracterizado en el SNC, el efecto del baclofen sobre estos receptores fue descrito originalmente en la periferia (Bowery y col., 1981; Bowery 1993). En el GCS, se ha sugerido la presencia de sitios de unión tipo $GABA_B$ (Farkas y col., 1986) posiblemente asociados a la inhibición de la liberación de 3H -ACh inducida por alta $[K^+]_e$ (Farkas y col., 1986), pero hasta el momento no ha sido estudiado el efecto del baclofen sobre la transmisión ganglionar.

La figura 38A muestra registros del PAC obtenidos antes, durante una perfusión con baclofen 100 μM y 5 min después de iniciar el lavado; puede observarse que en forma similar al GABA y al muscimol, el baclofen produce una inhibición de la transmisión que se puede detectar como una reducción de la amplitud del PAC postganglionar, en la Fig. 38B se grafican los cambios de la amplitud en función del tiempo para el experimento de la Fig. 38A. Este agonista, a diferencia del GABA y muscimol, no produce desensibilización del efecto inhibitorio (Figura 38C) durante perfusiones de 5 min con concentraciones aún mayores a las cuales GABA y muscimol sí lo hacen; este resultado sugiere que, como es de esperar, el baclofen no provoca activación de receptores $GABA_A$.

Siguiendo el mismo tipo de diseño que para GABA y muscimol, se estudió la dependencia del efecto del baclofen con su concentración en el medio de perfusión. En la Figura 39 podemos ver los resultados de este grupo de experimentos. Igual que aquellos,

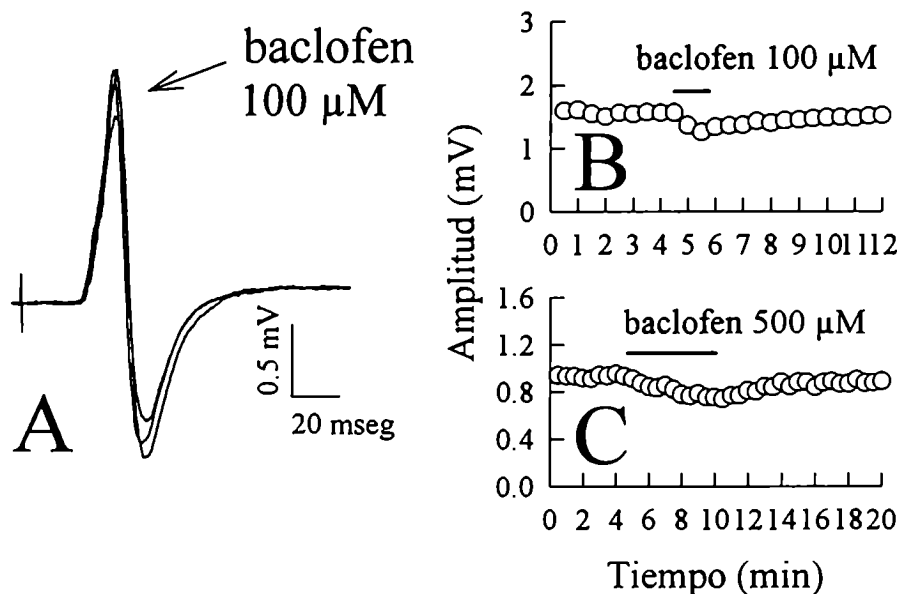


Figura 38. Efecto del agonista GABA_B baclofen sobre la transmisión ganglionar. (A) registros de un experimento representativo obtenidos antes, durante el bloqueo máximo (flecha) y después de la perfusión con baclofen 100 μM. (B) Curso temporal del bloqueo de la transmisión por perfusión de 60 seg con baclofen 100 μM; (C) Curso temporal del bloqueo por una perfusión de 5 min con baclofen 500 μM.

el baclofen produce inhibición de la transmisión en forma concentración dependiente, se pudo ajustar una curva sigmoidea y se estimó para estos datos una [baclofen]₅₀ de $95 \pm 19 \mu\text{M}$, lo cual sugiere una potencia menor que la de las otras dos drogas. El efecto máximo del baclofen (~ 30 % de inhibición) en tanto, fue claramente menor que el del GABA o muscimol (~ 90 %). El efecto de las concentraciones mayores de baclofen (1 y 2 mM) fue virtualmente idéntico a los de la Fig. 39 en experimentos independientes y en los cuales la preparación no había estado expuesta a ninguna droga previamente (resultados no mostrados); además, si bien para la curva concentración-respuesta se utilizaron perfusiones de 60 seg, aun a altas concentraciones (2 mM) no se detectó desensibilización para el efecto del baclofen en perfusiones de mayor duración (5 min).

Los resultados obtenidos mediante el uso de agonistas farmacológicos sugieren que el efecto inhibitorio de la transmisión es mediado por receptores para GABA_A, aparentemente de ambos tipos A y B. El agonista GABA_A muscimol produce un efecto máximo comparable al del GABA (~ 80 - 90 %) lo cual es compatible con que el agonista endógeno actúe puramente a través de receptores GABA_A. Sin embargo, el agonista GABA_B baclofen también produce inhibición, aunque este efecto se satura en

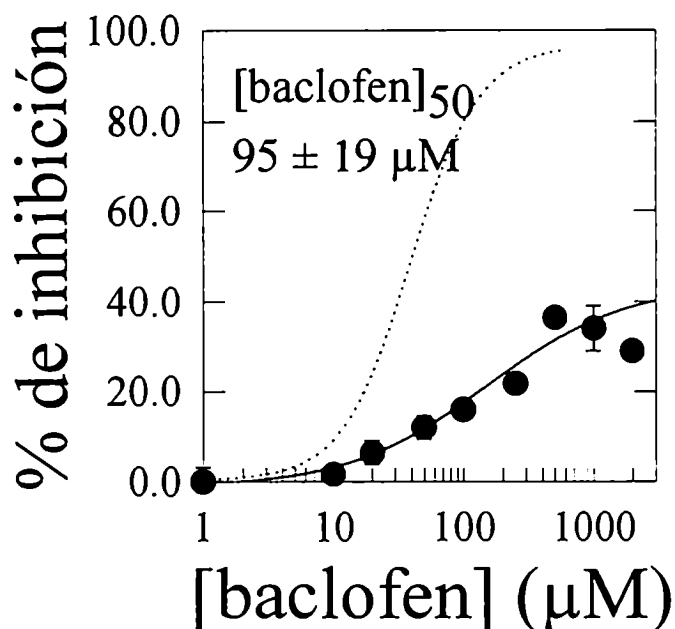


Figura 39. Curva concentración-efecto para el bloqueo de la transmisión por baclofen. Se grafica el bloqueo máximo desarrollado por perfusiones de 60 seg separadas por 30 min de lavado durante estimulación supramáxima a 0.017 Hz. Se muestran medias \pm e.s., $n = 3$. se ajustó a los datos una curva sigmoidea $r = 0.996$. (Ecuación logística: $I \% = E_{max}([baclofen]^n / ([baclofen]^n + [CI_{50}]^n))$). E_{max} = efecto máximo. En línea de puntos se muestra la curva ajustada a los datos obtenidos con GABA (ver Fig. 35).

un máximo de $\sim 30\%$. Es de esperar que el efecto máximo desarrollado por GABA dé cuenta de la suma de los aparentes efectos $GABA_A$ y $GABA_B$, por lo cual parece razonable suponer que al menos uno de los dos agonistas tiene un efecto no específico en nuestros experimentos, ya que la suma de sus efectos máximos ($\sim 120\%$) supera al del GABA.

Como el efecto del baclofen alcanza un "plateau" en un valor de inhibición menor que el máximo observado con GABA ó muscimol, parece improbable que el efecto del agonista $GABA_B$ se deba a la activación no selectiva de receptores $GABA_A$. Por su parte, en concentraciones altas comparadas con su K_d para los receptores $GABA_A$ (en el orden nM bajo), el muscimol puede activar a los receptores $GABA_B$ (Chuluyan y col., 1992).

Para intentar discriminar en qué grado participan los receptores $GABA_A$ y $GABA_B$ en el efecto inhibitorio de la transmisión ganglionar, se realizaron los experimentos descritos a continuación usando antagonistas farmacológicos específicos.

En la Tabla 5 se muestran los resultados obtenidos en experimentos en los que se estudió el efecto inhibitorio de la transmisión desarrollado por GABA perfundido junto con picrotoxina, un bloqueante del canal de Cl^- asociado al receptor $GABA_A$; bicuculina, antagonista competitivo del efecto del GABA sobre estos receptores ó 2-hidroxisaclofen, antagonista del efecto del GABA sobre los receptores $GABA_B$.

Tabla 5. Efecto de antagonistas de receptores para GABA sobre el efecto inhibitorio de la transmisión.

Grupo experimental	% de bloqueo	n
GABA 50 μ M	55.5 \pm 5.9	3
GABA 50 μ M + bicuculina 10 μ M	22.1 \pm 1.1*	
GABA 250 μ M	79.9 \pm 10.5	2
GABA 250 μ M + bicuculina 50 μ M	62.2 \pm 8.1	
GABA 250 μ M	82.7 \pm 6.0	4
GABA 250 μ M + picrotoxina 50 μ M	23.2 \pm 1.5*	
GABA 250 μ M	87.0 \pm 6.0	2
GABA 250 μ M + picrotoxina 100 μ M	22.5 \pm 4.5	
GABA 50 μ M	44.4 \pm 8.8	3
GABA 50 μ M + 2OH-saclofen 50 μ M	38.6 \pm 7.9	
GABA 100 μ M	67.6 \pm 12.0	3
GABA 100 μ M + 2OH-saclofen 50 μ M	66.5 \pm 18	

Los antagonistas se aplicaron durante 60 seg junto con el GABA (excepto en el experimento con GABA y 2-hidroxisaclofen 50 μ M, donde el antagonista se agregó 10 min antes que el GABA) a través del medio de perfusión. En cada experimento se aplicó GABA sólo (60 seg), seguido por la aplicación en presencia de antagonista tras, al menos 30 min de lavado. Se muestran media \pm e.s. * = P < 0.05 versus GABA solo. test t de Student.

Cualitativamente, los resultados expuestos en la Tabla 5 muestran que el efecto del GABA fue sensible a picrotoxina y bicuculina pero resistente a 2-hidroxisaclofen, indicando que la inhibición de la transmisión ganglionar por aplicación de GABA es debida principalmente a la activación de receptores tipo GABA_A y que el efecto del baclofen probablemente se deba a una acción no selectiva de la droga, posiblemente activación de los receptores GABA_A. Entre los antagonistas GABA_B comercialmente disponibles, phaclofen y 2-hidroxisaclofen, éste último es el que posee mayor selectividad y potencia (Bowery, 1993); sin embargo, existen actualmente nuevos y mejores antagonistas tales como el CGP 35348 (Bowery, 1993; Davies y Collingridge, 1993) que deberán ser ensayados en el futuro antes de descartar definitivamente la participación de receptores GABA_B en la inhibición de la transmisión en el GCS.

Con la metodología de estímulo y registro usada en nuestros experimentos no es posible en principio determinar el sitio de acción del GABA aplicado al medio de perfusión. La despolarización ganglionar mediada por GABA es inalterada por la desnervación preganglionar crónica, indicando que este efecto es exclusivamente postsináptico (Bowery y Brown, 1974). Es interesante notar que la inhibición de la transmisión descrita aquí exhibe una CE_{50} y farmacología similares a las descritas para dos respuestas evidentemente postsinápticas: la despolarización ganglionar (Bowery y Brown, 1974) y la activación por GABA de una corriente de Cl^- en las neuronas postganglionares disociadas (Aguayo y col., 1993).

Aunque estas evidencias son compatibles con que el GABA ejerza un efecto postsináptico, no se puede descartar que el aminoácido actúe también a nivel presináptico; de hecho, ya hemos mencionado que usando métodos diferentes al registro del PAC postganglionar se han descrito en el GCS efectos del GABA sobre la presinapsis (Brown y Higgins, 1979, Farkas y col., 1986).

Efecto del GABA sobre la transmisión dirigida hacia el nervio carotídeo externo.

Aunque en los experimentos presentados hasta este punto hablamos del bloqueo de la transmisión ganglionar, en todos los casos se registró el potencial de acción compuesto postganglionar en el nervio carotídeo interno (NCI) es decir que se estudió la transmisión mediada por la población de sinapsis "dirigida" hacia dicha vía de salida. Ya mencionamos en la Introducción que son varios los troncos nerviosos por los cuales los axones de las neuronas postganglionares proyectan para dirigirse hacia los órganos blanco. Los más importantes son el NCI y el nervio carotídeo externo (NCE); entre ambos llevan el ~90 % de los axones que salen del GCS (~40 % el NCI y ~50 % el NCE).

Las neuronas que proyectan por cada uno de estos dos nervios inervan órganos blanco diferentes (Bowers y col., 1984; Flett y Bell, 1991) por lo cual la regulación de la transmisión hacia el NCI o el NCE puede tener consecuencias fisiológicas distintas. Además, ya mencionamos que por el NCE proyectan axones que provienen de ganglios inferiores en la cadena simpática, estas fibras ("through fibers" ó "axones que atraviesan") ingresan al GCS desde el TSC y salen via el NCE sin hacer sinapsis en el ganglio (Prigioni y col., 1990; Romeo y col., 1986; Bowers y Zigmond, 1981); en el NCI estas fibras son minoritarias o inexistentes.

En vista de estas diferencias, resultó interesante evaluar si el GABA podía producir algún efecto sobre la transmisión excitatoria hacia la población de células que proyectan via el NCE y de existir ese efecto, compararlo con el desarrollado sobre la población dirigida hacia el NCI. Dado que los órganos blanco ejercen influencias retrógradas sobre las neuronas que los inervan, las diferencias respecto de los blancos inervados podrían generar diferencias funcionales entre las neuronas y/o sinapsis dirigidas a cada nervio.

Los experimentos indicaron que la aplicación de GABA exógeno también inhibe la transmisión dirigida hacia el NCE (Figura 40A1), aunque este efecto

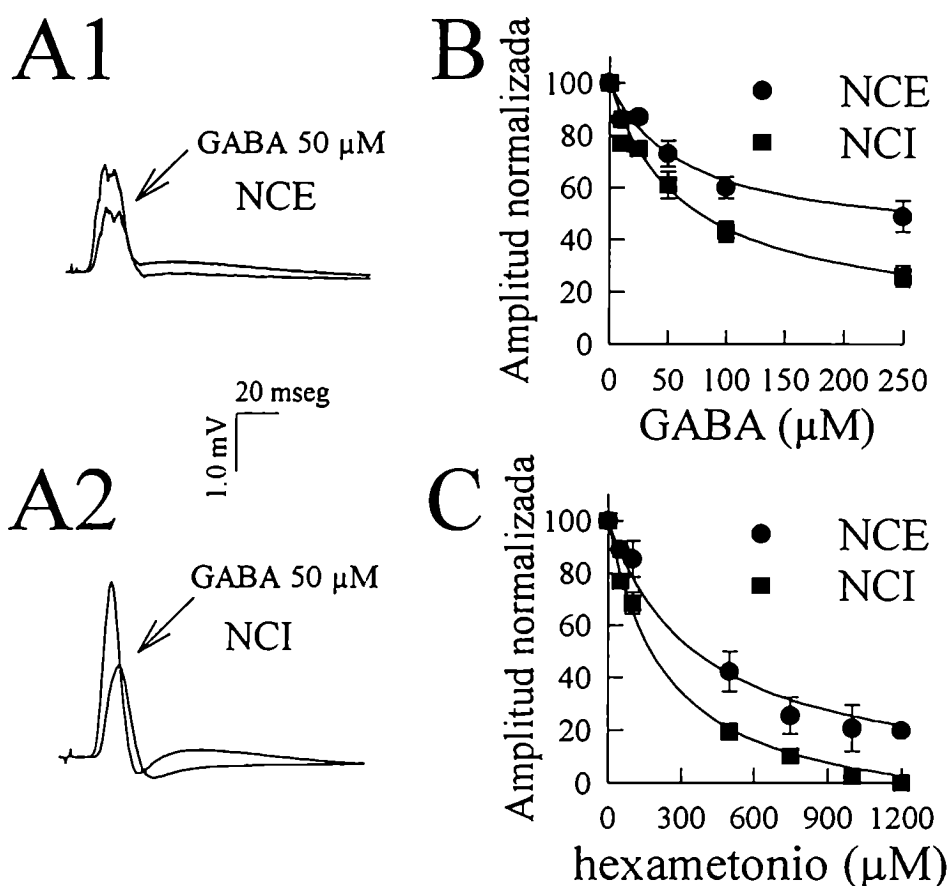


Figura 40. Efecto del GABA sobre la transmisión dirigida al nervio carotídeo externo (NCE). (A) Registros representativos en los que se examinó el efecto del GABA sobre la transmisión al NCE (A1) y posteriormente al NCI en la misma preparación (A2). (B) y (C) Dependencia con la concentración de los efectos del GABA y hexametonio. Cada concentración se probó sobre la transmisión a cada nervio postganglionar en un mismo GCS simultánea (2 GCS) o sucesivamente (14 GCS). Se muestran medias \pm e.s. n de 2 a 5. .

parecía ser significativamente menor que el observado en la transmisión al NCI, a concentraciones equimolares de GABA (Figura 40A2).

Para analizar mejor esta aparente diferencia de sensibilidad al GABA, se estudió el efecto del aminoácido sobre la transmisión, en experimentos donde se registró simultánea ó sucesivamente en una misma preparación, el potencial de acción compuesto en el NCI y el NCE (ver Fig. 12, Materiales y métodos). Independientemente de la secuencia (NCE \rightarrow NCI ó NCI \rightarrow NCE) en que se analizó el efecto del GABA, en todo el rango de concentraciones la inhibición de la transmisión fue mayor en el NCI (Figura 40B). Aunque en estos experimentos las CE_{50} fueron similares ($[GABA]_{50-NCI} = 56 \pm 8 \mu M$; $[GABA]_{50-NCE} = 64 \pm 14 \mu M$, diferencia no significativa, $P > 0.5$ test t de Student), el efecto máximo fue significativamente menor para la inhibición hacia el NCE (Figura 40B).

Estos resultados sugieren que en la población de fibras que proyectan por el NCE hay un porcentaje cuyo reclutamiento por estimulación sináptica es insensible al efecto del GABA y este porcentaje es mayor que en caso del NCI. Sin embargo, es necesario determinar en qué medida contribuyen a la señal registrada en el NCE los "axones que atraviesan", ya que éstos son reclutados por la estimulación eléctrica del TSC y la propagación axónica del potencial de acción debería ser, en principio, insensible al efecto del GABA.

Para discriminar esta posibilidad, comparamos el efecto del antagonista nicotínico ganglionar hexametonio sobre la transmisión al NCE y NCI en una misma preparación, siguiendo un protocolo similar al anterior. Los resultados obtenidos se grafican en la Fig. 40C y muestran que, a diferencia del NCI, la transmisión hacia un cierto porcentaje de las fibras que proyectan al NCE es resistente al bloqueo por hexametonio, lo que se refleja en que la máxima reducción de la amplitud del PAC fue de ~ 80 %, versus 100 % en el NCI. Podemos sugerir entonces que la diferencia de sensibilidad al GABA entre la transmisión dirigida al NCI y al NCE se debe principalmente a la presencia de una mayor proporción de "through fibers" en el NCE, en las que la propagación del potencial de acción es resistente tanto al hexametonio como al GABA.

Esta similitud entre el efecto del GABA y el del hexametonio, droga que bloquea la transmisión nicotínica pero no la propagación de potenciales de acción, sugiere que el aminoácido actúa sobre las vías de transmisión sináptica nicotínica. De todas maneras, hay evidencias que sugieren la presencia de receptores para GABA en axones del TSC (Brown y Marsh, 1978) por lo cual podría ocurrir que el efecto observado se deba a un bloqueo de la propagación del potencial de acción entre el sitio de estimulación y el terminal sináptico a consecuencia de la activación de estos receptores axonales para GABA. En otras regiones del sistema nervioso se ha propuesto que como parte de un mecanismo fisiológico, el GABA puede regular la propagación axónica del potencial de acción (Sakatani y col., 1993; Wall, 1995; Jackson y Zhang, 1995). Decidimos entonces estudiar en qué medida el GABA puede afectar la propagación del potencial de acción en el tronco nervioso preganglionar.

Para ello, se registraron, en una misma preparación, los PAC generados en el TSC y en el NCI, ambos por estimulación eléctrica del TSC (ver Fig. 12D, Materiales y Métodos). En 2 experimentos, la perfusión con GABA 500 μ M redujo significativamente la amplitud del PAC que se origina post-sinápticamente en el NCI y produjo un cierto efecto bloqueante de la propagación del PAC en el TSC, pero este efecto fue menor que el observado simultáneamente en la postsinapsis, los resultados de uno de estos experimentos se muestran en la Figura 41. Esto sugirió que la mayor parte (~ 86 % en el experimento de la Fig. 41) del efecto del GABA es sobre la interacción pre- postsináptica y no sobre la propagación del potencial de acción preganglionar. Resultados similares a los de la Figura 41 se obtuvieron en otro experimento independiente.

Dada la ubicación del electrodo de registro en el TSC (Fig. 12D) no se puede descartar que el GABA actúe sobre los axones preganglionares una vez que ingresan al cuerpo del ganglio (y antes de los terminales sinápticos) pero sí se descarta un efecto significativo de la activación de los receptores descritos en el TSC (Brown y Marsh, 1978).

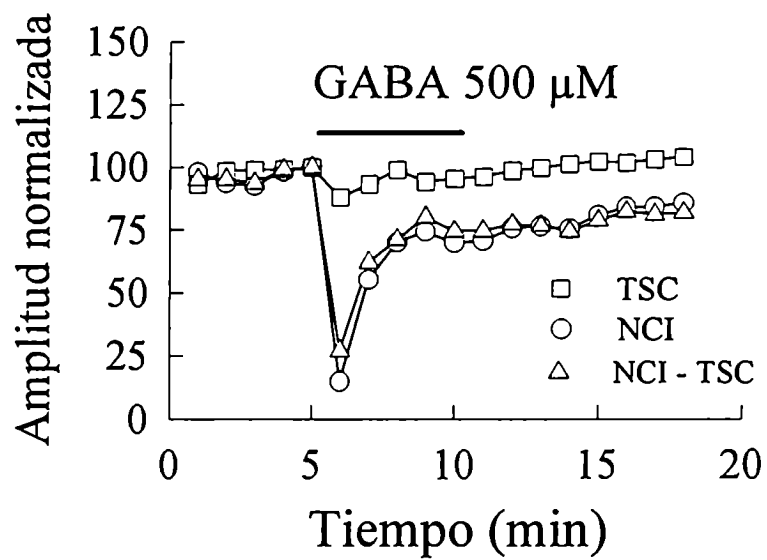


Figura 41 . Efecto de la aplicación de GABA sobre el PAC preganglionar registrado en el TSC (propagación) y el postganglionar registrado en el NCI (transmisión). GABA se perfundió durante la estimulación del TSC a 0.017 Hz. Como muestra la Fig., la mayor parte del bloqueo de la transmisión (O) se explica independientemente del bloqueo de la propagación del PAC preganglionar (□), como muestra la diferencia (Δ).

2.2. Efecto del GABA sobre la potenciación de largo plazo

Efecto de la aplicación de GABA exógeno

Los resultados presentados hasta aquí indican que, en forma coincidente con su acción en el SNC, en el GCS el GABA produce inhibición neta de la transmisión sináptica excitatoria. Aunque la metodología empleada no nos permite establecer el sitio ni el mecanismo preciso de acción del aminoácido, la farmacología indica que es probable que operen receptores tipo GABA_A similares a los que median la inhibición por GABA en el SNC. La participación de receptores GABA_B en el GCS es, en cambio, menos clara.

Entre los efectos desarrollados por el GABA que se libera desde interneuronas en el SNC, se encuentra la inhibición del desarrollo de potenciación de largo plazo de la transmisión glutamatérgica (Gustafsson y Wigström, 1988), una forma de plasticidad sináptica ampliamente estudiada y considerada por algunos como parte de la base celular subyacente al aprendizaje y/o la memoria (Eichenbaum, 1993; Izquierdo, 1994). Diversos estudios usando drogas que afectan la transmisión GABAérgica (Wigström y Gustafsson, 1983; Gustafsson y Wigström, 1988; Mott y col., 1991; Davies y col., 1991) y agentes que potencian el efecto del GABA como las benzodiacepinas (Del Cerro y col., 1992) muestran que la inducción de potenciación de largo plazo (ó LTP, del inglés "Long-Term Potentiation") está sujeta a la inhibición por GABA en el hipocampo y otras regiones del SNC (Fregnac y Schulz, 1992; Kanter y col., 1993).

Como mencionamos previamente en la Introducción, las sinapsis nicotínicas del GCS y de otros ganglios autonómicos (Koyano y col., 1985; Bachoo y Polosa, 1991; Scott y Bennett, 1993) tienen la capacidad de desarrollar una forma de potenciación post-tetánica de largo plazo inducida por un período breve de estimulación repetitiva (Brown y McAfee, 1982). Debido a que la duración de la potenciación ganglionar (en el orden de horas) es mayor que la de la potenciación posttetánica clásica (en el orden de seg o min, Johnston y Wu, 1995) y por analogía con el fenómeno observado en el SNC, la potenciación de la transmisión sináptica ganglionar ha sido clasificada como LTP (Briggs y col., 1985a). Pese a ello sin duda se trata de un fenómeno sináptico distinto a la potenciación NMDA-dependiente de la transmisión glutamatérgica central, aunque tiene cierta similitud con la LTP NMDA-independiente descrita en el área CA3 del hipocampo (Weisskopf y col., 1994).

En vista de que una función aparente de la transmisión GABAérgica en el SNC es regular el desarrollo de plasticidad sináptica, decidimos probar si el GABA tiene una acción similar sobre la potenciación de la transmisión excitatoria en las sinapsis periféricas del GCS.

La potenciación de la transmisión ganglionar se puede detectar a través del aumento de la amplitud del potencial de acción compuesto postganglionar, de hecho fue originalmente descrita mediante esta metodología (Brown y McAfee, 1982). La detección de LTP mediante esta técnica requiere obtener una respuesta postsináptica submáxima susceptible de ser potenciada, este requerimiento puede lograrse a través de distintas condiciones experimentales (Briggs y col., 1985a; Alonso deFlorida y col., 1991); para los experimentos descritos a continuación utilizamos la estimulación preganglionar supramáxima en presencia continua del antagonista nicotínico hexametonio en concentración tal (80-200 μ M) que permita obtener una respuesta postsináptica submáxima de ~ 30 - 40 % del valor máximo (ver materiales y métodos).

En la Figura 42 se muestran los resultados de un experimento representativo en el cual a tiempo = 0 min se aplicó un tren (20 seg) de estimulación eléctrica repetitiva (20 Hz) al

nervio preganglionar. Como puede observarse, la estimulación repetitiva produce un aumento de la amplitud del PAC registrado en el NCI, en este experimento la amplitud de la señal permanece por encima de la línea de base por al menos dos horas (Fig. 42). En nuestras condiciones experimentales y tal como se ha descrito (Brown y Mc Afee, 1982; Briggs y col., 1985a), el aumento post-tetania de la amplitud del PAC muestra al menos dos componentes: una inicial que decae en tiempo corto (potenciación post-tetánica de corto plazo ó PTP) y una segunda componente con tiempo de decaimiento mayor (potenciación post-tetánica de largo plazo ó LTP). De acuerdo con Briggs y col (Brown y Mc Afee, 1982; Briggs y col., 1985a) la potenciación puede ser cuantificada mediante la variable adimensional

$$P(t) = [V(t) - V_c] / V_c \quad (1)$$

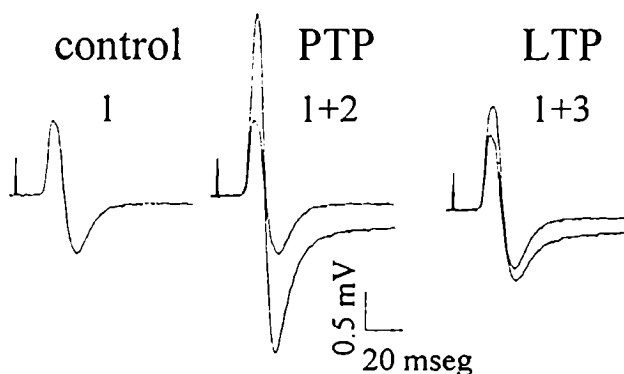
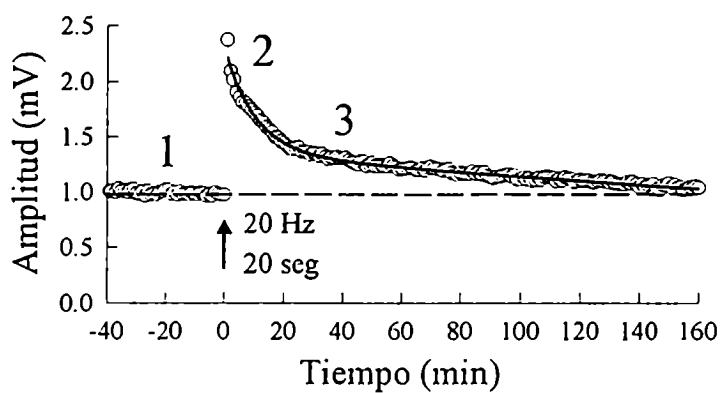


Figura 42. Potenciación posttetánica de largo plazo en el GCS. Arriba: curso temporal de la potenciación inducida por la aplicación de un tren de estimulación repetitiva (20 seg a 20 Hz, flecha) en presencia continua de atropina y durante bloqueo parcial de la transmisión por hexametonio, la frecuencia de estimulación basal fue en este y en todos lo experimentos posteriores de 0.017 hZ. Abajo: registros del PAC registrado en el NCI a los tiempos indicados en la Fig. superior (1, 2 y 3) que coinciden con la potenciación de corto (PTP) y largo plazo (LTP).

que normaliza la amplitud de la señal al tiempo t post estimulación tetánica ($V(t)$) como el incremento fraccional sobre la amplitud control pre tetania (V_c). El curso temporal de la potenciación es descrito adecuadamente por la suma de dos exponenciales (Briggs y col., 1985):

$$P(t) = P e^{(-t / \tau_P)} + L e^{(-t / \tau_L)} \quad (2)$$

La Tabla 6 resume los resultados obtenidos tras computar los parámetros del decaimiento exponencial en cinco experimentos donde se indujo potenciación por aplicación de un tren de 20 seg a 20 Hz durante estimulación supramáxima a 0.017 Hz en presencia continua de hexametonio y del antagonista muscarínico atropina, se transformaron los datos según la ecuación (1) y se ajustó la ecuación (2) mediante una regresión no lineal.

Como muestra la Tabla 6, los parámetros obtenidos en estos experimentos no difieren significativamente de los reportados previamente (Brown y Mc Afee, 1982), por lo cual concluimos que la potenciación post-tetánica (PTP + LTP) observada en nuestras condiciones experimentales es similar a la potenciación de la transmisión nicotínica ya descrita (Brown y Mc Afee, 1982; Briggs y col., 1985a).

Tabla 6. Parámetros descriptivos del decaimiento exponencial de la potenciación post-tetánica de la transmisión nicotínica en el GCS

parámetro	este trabajo	datos previos ^a
P	1.8 ± 0.4	1.0 ± 0.2 NS
τ_P (min)	2.6 ± 1.3	3.2 ± 0.5 NS
L	1.9 ± 0.6	1.2 ± 0.2 NS
τ_L (min)	50 ± 10	82 ± 26 NS

En cinco experimentos donde se indujo potenciación por estimulación tetánica (20 seg, 20 Hz en presencia de atropina 2 μ M y bloqueo parcial por hexametonio) se ajustó la ecuación doble exponencial (2) a los datos normalizados según la ecuación (1) y los parámetros obtenidos, que se muestran en la primer columna, no fueron estadísticamente diferentes de los datos reportados originalmente por Brown y McAfee (a), (Brown y McAfee, 1982). NS: diferencias no significativas versus los datos de la columna 2, test t de Student.

Es importante volver a destacar que la inducción de LTP ganglionar por estimulación tetánica no requiere que haya transmisión sináptica excitatoria durante el tren de estímulos. De hecho, si durante la estimulación repetitiva se bloquea totalmente la transmisión aplicando antagonistas nicotínicos y muscarínicos, la inducción de LTP no se afecta (Briggs y col., 1985a; Scott y Bennett, 1993). Como mencionamos en la Introducción, ésta y otras evidencias (Briggs y col., 1985a; Koyano y col., 1985; Briggs y McAfee, 1988; Scott y Bennet, 1993) sugieren que la inducción (y probablemente la expresión, Morales y col., 1994) de LTP ganglionar es un mecanismo predominantemente presináptico.

Teniendo en cuenta esta información, es razonable deducir que para que el GABA regule la inducción de LTP debe actuar sobre la presinapsis y afectando algún mecanismo involucrado en la génesis de la potenciación. En la Figura 43 se grafican los resultados de un experimento en el cual se aplicó un tren de estimulación repetitiva (20 seg, 20 Hz, a $t = 0$) a la presinapsis durante la segunda mitad de una perfusión de 60 seg con solución conteniendo GABA $250 \mu\text{M}$. En estas condiciones: en primer lugar, no se observa la potenciación de corto plazo (PTP) en los minutos siguientes a la estimulación tetánica, pero debido a que la cinética

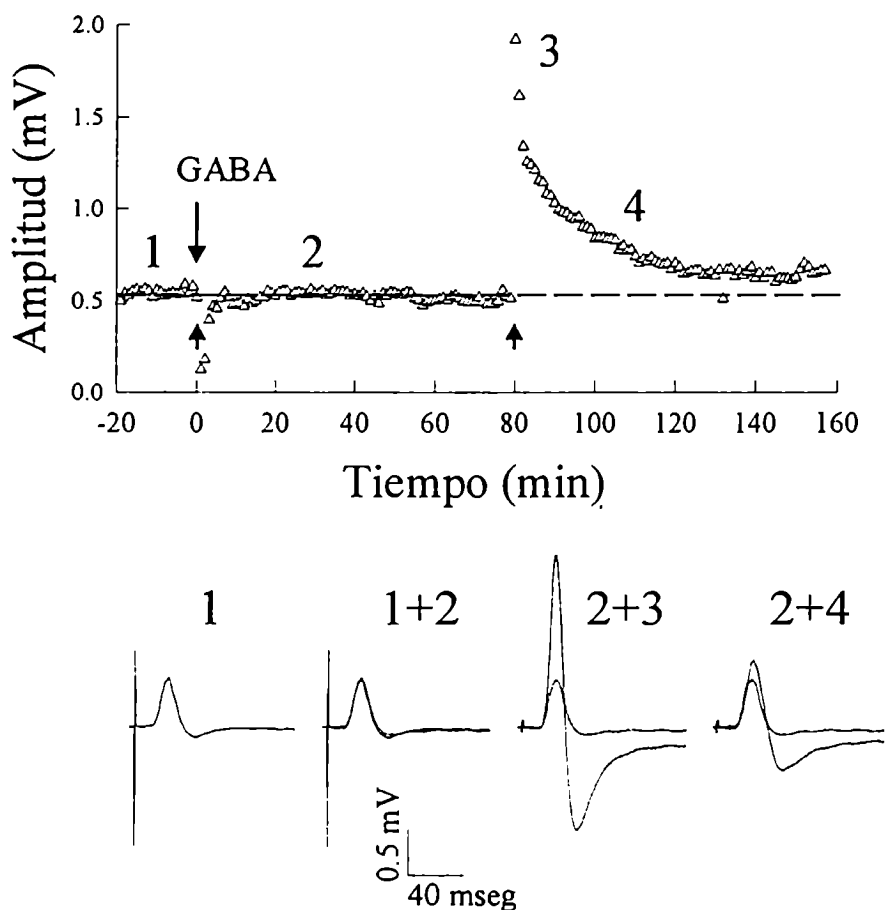


Figura 43. Efecto de la aplicación de GABA exógeno sobre la inducción de potenciación ganglionar por estimulación preganglionar repetitiva. Arriba: se grafica la amplitud del PAC en función del tiempo en un experimento en el que se aplicó un primer tren (20 seg, 20 Hz, flecha hacia arriba) a tiempo = 0, durante una perfusión de 60 seg con GABA ($250 \mu\text{M}$, flecha hacia abajo); a $t = 80$ se aplicó un segundo tren idéntico al primero (flecha) en ausencia de GABA. Abajo: registros de PACs tomados en el mismo experimento a los tiempo indicados por los números.

de decaimiento de la PTP (decae en $\sim 3 \tau_{\text{PTP}} \cong 8$ min) se superpone con el tiempo necesario para la remoción del GABA (o de su efecto) por lavado, el bloqueo de la transmisión que ocurre durante este período no permite discriminar si el GABA afecta el mecanismo que genera PTP. En segundo lugar, es evidente que la presencia de GABA durante el tren inhibió, en este experimento por completo, la inducción de LTP (Fig. 43). Un tren de estímulos

idéntico al anterior aplicado posteriormente ($t = 80$ min) a la misma preparación pero en ausencia de GABA, fue capaz de desarrollar ambos componentes de la potenciación posttetánica, indicando que el efecto del GABA es reversible.

La Figura 44A resume los resultados de 5 experimentos independientes en los que se aplicó el tren de estimulación repetitiva (20 seg, 20 Hz) durante la perfusión con GABA (250 μ M, 60 seg), comparados con 6 experimentos control. Tal como es aparente por inspección visual de los datos, no fue posible ajustar la ecuación doble exponencial a los experimentos donde la potenciación fue inhibida por GABA. En lugar de la potenciación característica, en presencia de GABA se observó bien un bloqueo total de la LTP (como en la Fig. 43) ó la aparición de una potenciación leve con curso temporal irregular.

La inhibición de la inducción de LTP se computó entonces mediante la variable $P(t) = [V(t) - V_c] / V_c$ (Brown y McAfee, 1982). Para evaluar la magnitud de la LTP sin la interferencia del bloqueo de la transmisión por GABA, se cuantificó la potenciación a $t = 30$ min post-tetania ya que, como se mencionó anteriormente, en ocasiones la reversión total de la inhibición de la transmisión por GABA requirió ~ 20 min. Para estudiar una fase mas tardía de la LTP, $P(t)$ se evaluó también a $t = 50$ min post-tetania, tiempo al que la potenciación es aún significativa inclusive en los experimentos control en los que la misma tuvo menor magnitud y duración.

La Figura 44B muestra que la perfusión con GABA (250 μ M en el medio de perfusión) durante el tren de estímulos reduce significativamente la potenciación evaluada a los 30 y 50 min post-tetania. La perfusión con GABA 500 μ M ($n = 1$, resultados no mostrados), produjo una inhibición similar de la inducción de LTP mientras que a concentración 100 μ M, la inhibición de la potenciación por GABA fue menor (Fig. 44B). Es posible que para afectar el fenómeno de inducción de LTP se necesite un número mínimo elevado de receptores activados o que sea necesario un algún modo particular de activación del canal de Cl^- asociado al receptor $GABA_A$, sólo obtenido con altas concentraciones de agonista (Newland y col., 1991).

La capacidad del GABA para inhibir la inducción de potenciación implica que para producir este efecto, el aminoácido debe actuar directa o indirectamente sobre el locus en el cual tiene lugar la génesis de la LTP. Dado que actualmente se acepta que la inducción de LTP en el GCS de rata es un fenómeno enteramente presináptico (Briggs y col., 1985a; Briggs y col., 1985c; Briggs y McAfee, 1988; Briggs y col., 1988) concluimos que el GABA afecta el mecanismo de inducción en los terminales preganglionares.

Cuando la estimulación tetánica se aplicó hacia los segundos finales de una perfusión de 5 min con GABA 250 μ M (Figura 45), el efecto inhibitorio de la inducción de LTP no se observó (Figura 45). De estar este efecto mediado por la activación de receptores tipo $GABA_A$, una posibilidad es que la falla del aminoácido para bloquear la inducción de LTP en estas condiciones, se deba a la desensibilización de los receptores al momento de la estimulación tetánica.

La perfusión con GABA (250 μ M) por 60 seg 5 min después de la estimulación tetánica (Figura 45), produjo una reducción significativa de la magnitud de la LTP medida a $t = 30$ y $t = 50$ min post-tetania (Figura 45). Si bien la máxima inhibición de la potenciación se obtiene cuando la perfusión con GABA es coincidente con el tren de estimulación, estos resultados muestran que en los minutos siguientes al tren (al menos a los 5 min) la potenciación es susceptible de ser bloqueada por GABA. Posiblemente durante este período tenga lugar

algún proceso crítico (sensible a GABA) para el establecimiento definitivo o "consolidación" de la LTP ganglionar; otros investigadores han sugerido la existencia de un período de estabilización similar (Arai y col., 1990), GABA-sensible (Del Cerro y col., 1992) asociado a la potenciación sináptica de largo plazo en sinapsis centrales.

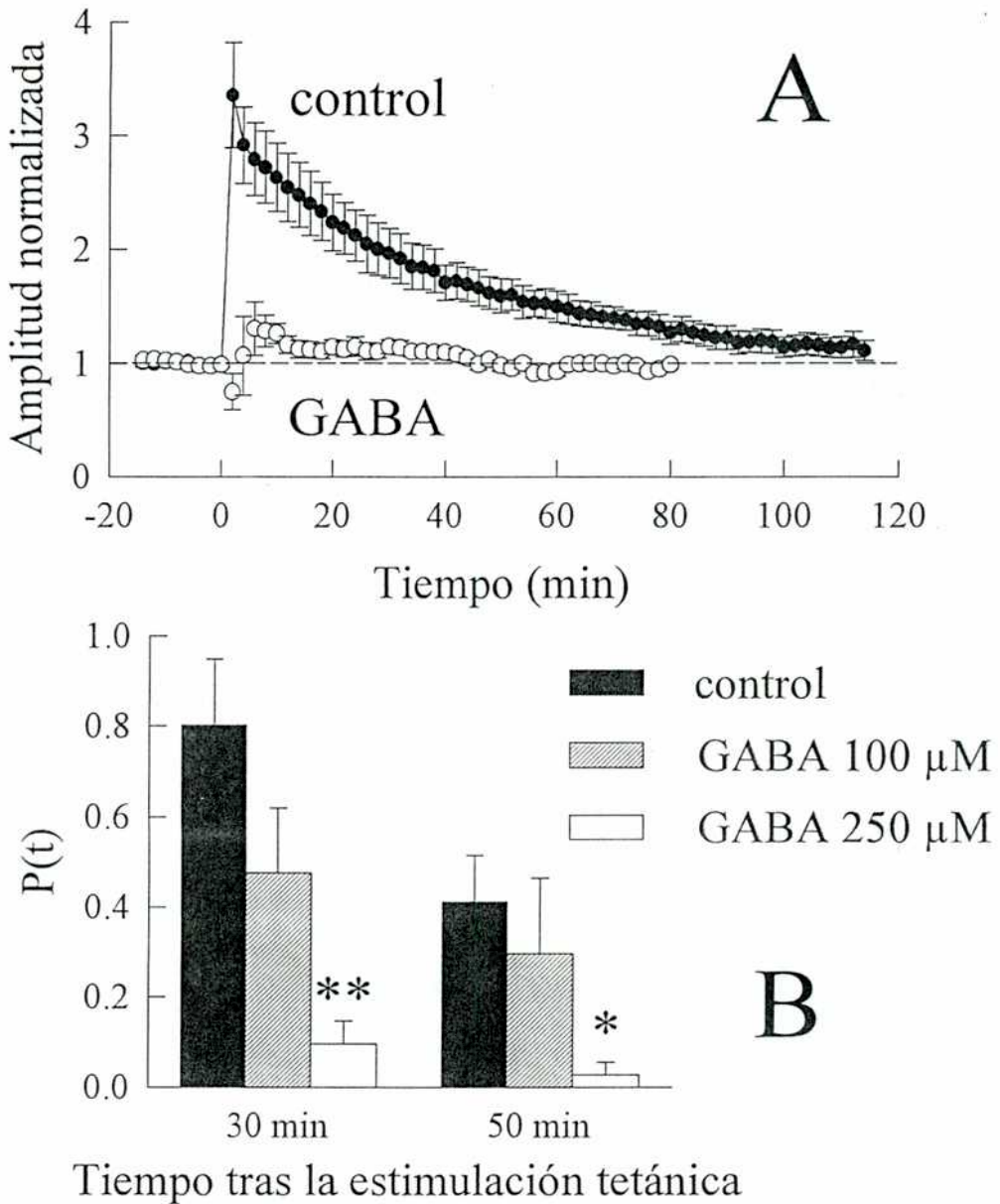


Figura 44. Efecto del GABA sobre la inducción de potenciación por estimulación preganglionar repetitiva. (A) Se grafica la amplitud normalizada (media \pm e.s.) del PAC en función del tiempo en 6 experimentos control y 5 donde se aplicó la estimulación tetánica durante la segunda mitad de una perfusión de 60 seg con GABA. (B) Se grafica la variable $P(t)$ calculada a dos tiempos (30 y 50 min) post-tetania en experimentos control y en los que el tren se aplicó durante una perfusión de 60 seg con GABA a las concentraciones indicadas. (media \pm e.s., $n = 5$ a 6). * = $P < 0.05$ ANOVA, test de Dunnet.

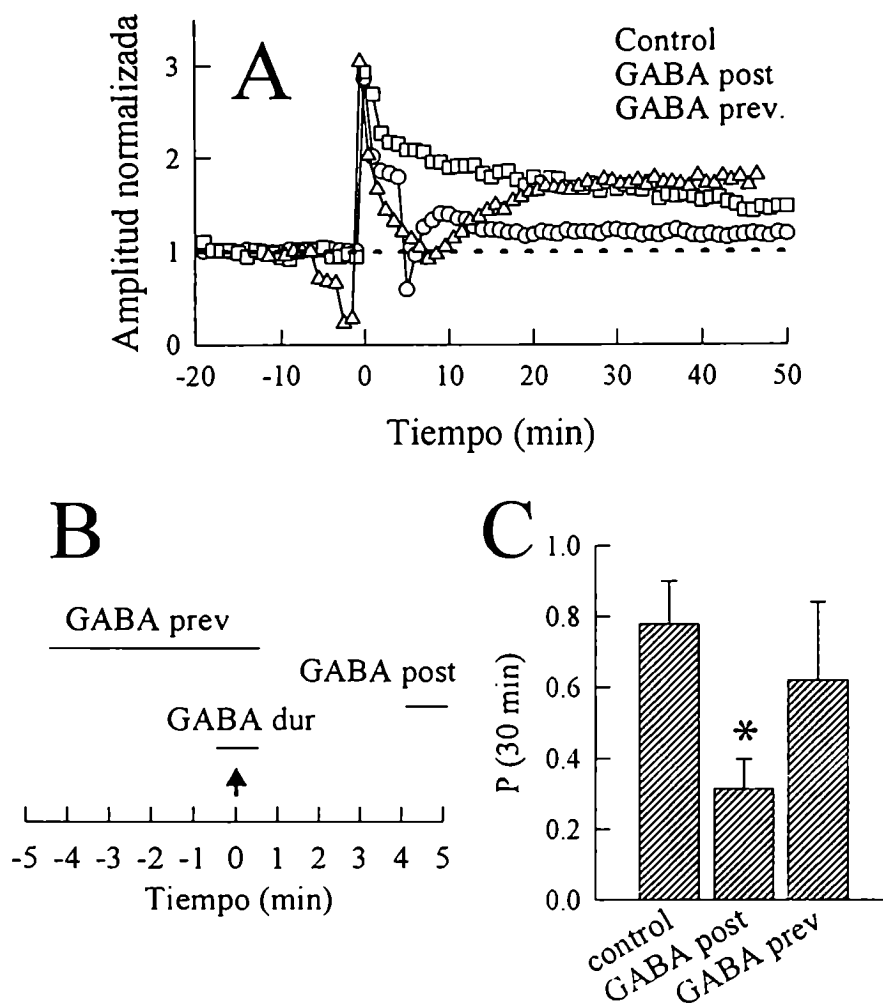


Figura 45. Dependencia con el tiempo del bloqueo de la inducción de LTP por GABA. (A) curso temporal de la amplitud en un experimento control y en dos experimentos en los que el GABA (250 μ M) se perfundió por 5 min o 60 seg siguiendo la relación temporal indicada en (B), donde la flecha representa la aplicación del tren (20 seg, 20 Hz). (C) Resumen de los experimentos realizados, se muestra la media \pm e.s., $n = 5$.

Farmacología

Para identificar el tipo de receptores involucrados en el efecto obtenido por aplicación de GABA, procedimos a evaluar la actividad de los agonistas de receptores GABA_A y GABA_B muscimol y baclofen. Aunque los resultados obtenidos al estudiar la farmacología de la inhibición de la transmisión por GABA sugieren que en este efecto predomina la activación de receptores GABA_A, no está claro que exista una relación directa entre el bloqueo de la transmisión y el de la inducción de LTP. Por otra parte, se ha descrito la presencia de canales de Ca²⁺ voltaje-dependientes tipo P en los terminales presinápticos del GCS (González Burgos y col., 1995) y dado que la actividad de estos canales puede ser regulada por baclofen a través

de receptores GABA_B (Mintz y Bean, 1993), existe la posibilidad de que durante el patrón de actividad sináptica obtenido por la estimulación tetánica (20 estímulos/seg) se exprese un efecto GABA_B no observado durante la estimulación a baja frecuencia (0.017 ó 0.033 estímulos/seg).

La perfusión con baclofen 50 μ M ó 250 μ M, no inhibió el desarrollo de PTP ni LTP (Figura 46B y C). GABA y baclofen se unen con idéntica afinidad a los receptores GABA_B (Bowery, 1993), por lo cual estos resultados parecen descartar la participación de estos receptores en el bloqueo de la LTP. De hecho, en 4 de 5 experimentos se pudo ajustar la ecuación doble exponencial y los parámetros obtenidos (no mostrados) en todo caso sugieren un ligero aumento en la magnitud y duración de la potenciación. Si durante la estimulación tetánica en el GCS se libera GABA endógeno, este resultado sería compatible con el rol que juega la activación de autoreceptores GABA_B en el SNC, donde, por inhibir la liberación de GABA, facilitan la inducción de LTP (Davies y col., 1991; Mott y col., 1991; Davies y Collingridge, 1993). Sin embargo, los resultados obtenidos en la parte inicial de esta Tesis sugieren que en el GCS la liberación de GABA no está sujeta al control por autoreceptores GABA_B. (ni GABA_A).

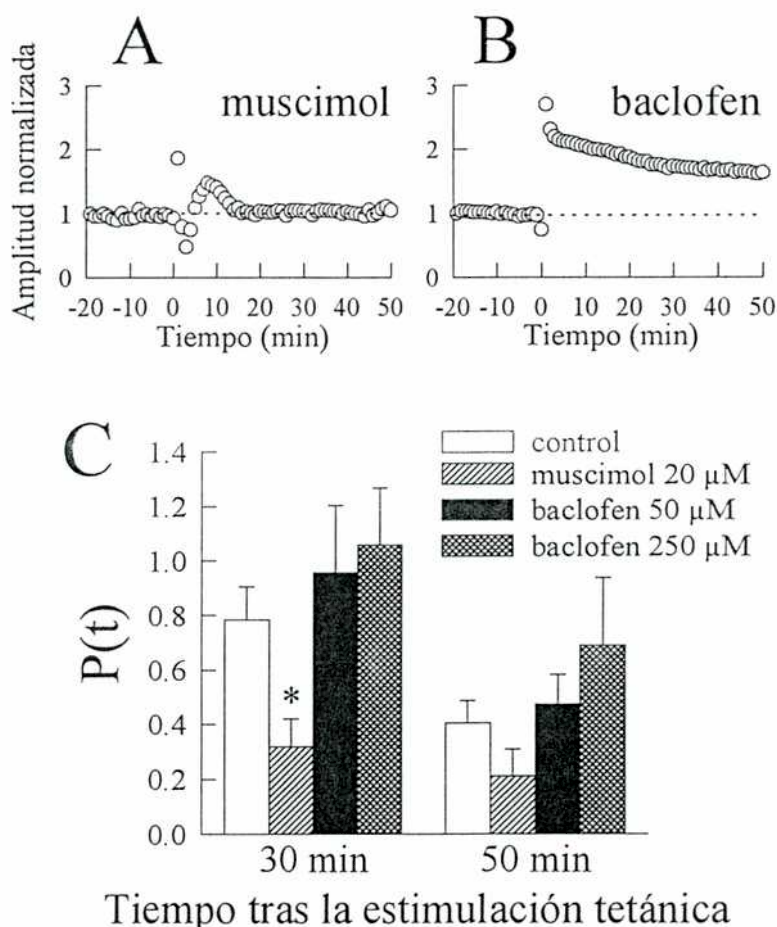


Figura 46. Efecto de agonistas de receptores de GABA sobre la inducción de potenciación por estimulación preganglionar repetitiva. (A) Resultados de un experimento representativo que muestra el bloqueo de la inducción de LTP por muscimol 20 μ M (B) un experimento similar donde se perfundió baclofen 250 μ M; (C) Resumen de los experimentos realizados con agonistas de receptores de GABA se muestran medias \pm e.s. n = 5.

La perfusión de 60 seg con muscimol (20 μ M) aplicada en coincidencia con el tren de estimulación repetitiva produjo una inhibición significativa de la potenciación (Figura 46A y C) y en algunos casos (Fig. 46A) la inhibición de la potenciación medida desde los 30 min en adelante fue total. Igual que tras la inhibición de la potenciación por GABA, no fue posible ajustar la ecuación (2) a los datos de los experimentos con muscimol. Estos resultados sugieren entonces que el bloqueo de la inducción de LTP está mediado fundamentalmente por la activación de receptores tipo GABA_A, en forma similar a lo observado para la inhibición de la transmisión.

Una prueba adicional de la farmacología de los receptores asociados a este efecto del GABA puede obtenerse mediante el uso de antagonistas. En particular, dados nuestros resultados previos, inicialmente decidimos evaluar el efecto de la picrotoxina.

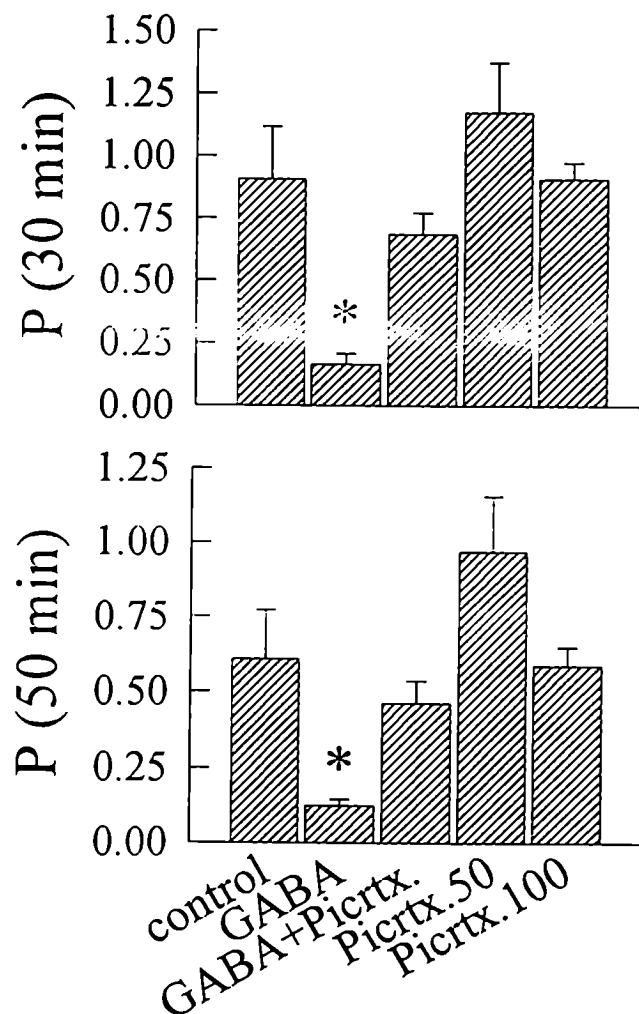


Figura 47. Efecto de la picrotoxina sobre la inhibición de la inducción de LTP mediada por GABA. Se grafica la potenciación ($P(t)$) medida a los 30 (arriba) y 50 min post-tetania. Se muestran medias \pm e.s. $n = 5$. Picrotx: picrotoxina.

La Figura 47 resume los resultados obtenidos en experimentos en los que se perfundió simultáneamente GABA (250 μM) y picrotoxina (100 μM) por 60 seg coincidiendo con un tren de 20 seg a 20 Hz; como se observa, en presencia de este bloqueante del canal de cloruro asociado a los receptores GABA_A, se previene la inhibición de la potenciación por GABA. Estos resultados, en conjunto con nuestros resultados previos que indican la falta de efecto del baclofen y la capacidad del muscimol para reproducir el efecto del GABA, muestran que la inhibición de la inducción de LTP ganglionar está mediada principalmente por la activación de receptores tipo GABA_A.

Los resultados de la Figura 47 muestran además, que la picrotoxina (50 ó 100 μM) aplicada via el medio de perfusión por 60 seg durante el tren, no produce por si misma ningún efecto sobre la inducción de LTP. Esto sugiere que, o bien la potenciación observada en estas condiciones experimentales no está sujeta al control por el GABA endógeno o que la estimulación tetánica no produce una liberación de GABA adecuada como para afectar la inducción de LTP. De ser así, se esperaría en presencia de picrotoxina obtener un aumento significativo en la magnitud y/o duración de la potenciación con respecto al control, hecho que fue observado solo en unos pocos experimentos (2 de 5 en picrotoxina 50 μM , 1 de 5 en 100 μM).

Facilitación por picrotoxina de la inducción de potenciación

Aunque estos resultados son en principio difíciles de conciliar con una participación del GABA endógeno en la regulación de la plasticidad sináptica ganglionar, al menos dos motivos permiten suponer que las condiciones experimentales utilizadas hasta aquí no sean las mas favorables para poner en evidencia esa supuesta acción del GABA.

Primero: por motivos mencionados anteriormente, en todos los experimentos discutidos hasta este punto la potenciación se estudió en condiciones de bloqueo nicotínico parcial por hexametonio y en presencia de atropina, por lo cual si la liberación de GABA endógeno por estimulación eléctrica preganglionar dependiera de alguna manera del efecto de la ACh, éste podría estar anulado o minimizado por la presencia de los antagonistas de los dos tipos de receptores para ACh presentes en el GCS (nicotínicos y muscarínicos).

Segundo: el protocolo de estimulación tetánica usado para inducir LTP (20 seg a 20 Hz) fue elegido porque es el mas frecuentemente utilizado en los trabajos previos; sin embargo la magnitud y duración de la potenciación ganglionar están graduadas en función de la frecuencia o duración del tren utilizado para inducirla (Briggs y col., 1985a). Entonces, es posible que el protocolo de inducción utilizado hasta aquí sea suficientemente "fuerte" como para superar la inhibición por el supuesto GABA endógeno aun en ausencia de antagonistas GABAérgicos.

En los experimentos descriptos a continuación se examinó el efecto de la picrotoxina (50 μM) sobre la inducción de LTP en ausencia de antagonistas de receptores para ACh y utilizando un protocolo de tetanización menos eficiente que el usado previamente, con la idea ya mencionada de que en estas condiciones esté favorecida la detección de un posible efecto del GABA endógeno.

Para obtener una respuesta postsináptica submáxima en ausencia de antagonistas colinérgicos, la estimulación preganglionar se hizo a voltaje submáximo de manera de reducir la amplitud del potencial postganglionar hasta un 30-40 % del valor máximo. Como describieron otros grupos previamente (Alonso deFlorida y col., 1991 y citas allí) durante la estimulación submáxima la línea de base de la transmisión fue mas fluctuante que en

estimulación supramáxima, pero ello no impidió detectar la potenciación tras la aplicación de un tren de estimulación tetánica.

Un ejemplo de esto se observa en el experimento graficado en la Figura 48 donde a tiempo = 15 min se aplicó un tren de 20 seg a 20 Hz, el cual produjo una potenciación evidente. Cuando la duración del período de estimulación repetitiva se redujo de 20 a 5 seg, en estas condiciones (estimulación preganglionar submáxima y sin antagonistas de ACh) la inducción de potenciación fue menos confiable: en varios experimentos no se detectó potenciación por sobre la línea de base y en los casos en los que fue detectable, fue significativamente menor que la observada tras aplicar un tren de mayor duración (Fig. 48).

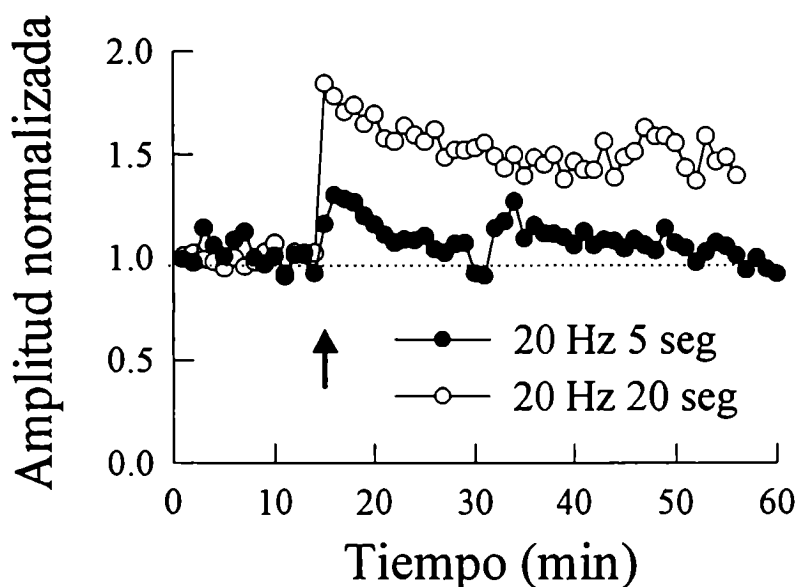


Figura 48. Efecto de la aplicación de un tren de estimulación tetánica durante la estimulación submáxima. En dos experimentos representativos, un tren tetánico "débil" (20 Hz 5 seg, círculos negros) induce una potenciación de menor magnitud y duración que un tren "fuerte" (20 Hz 20 seg, círculos blancos).

Para evaluar entonces la acción de la picrotoxina sobre la inducción de esta potenciación submáxima, se realizaron experimentos en los que la potenciación desarrollada en una preparación por un tren de 5 seg a 20 Hz y en ausencia de drogas, se comparó con la obtenida por un tren idéntico aplicado al ganglio contralateral del mismo animal pero en presencia de picrotoxina 50 μ M.

En la Figura 49 se observan registros obtenidos en dos experimentos en los cuales el tren de estimulación "débil" se aplicó a una preparación mantenida en solución normal (Fig 49, arriba) o al ganglio contralateral al cual se aplicó picrotoxina (50 μ M) a través del medio de perfusión 30 min antes de la estimulación tetánica. Los registros superpuestos muestran que en presencia de picrotoxina la potenciación desarrollada por el tren "débil" es mayor. Por analogía con lo observado por otros grupos en sinapsis centrales (Wigströmm y Gustafsson, 1983) llamamos a este efecto facilitación.

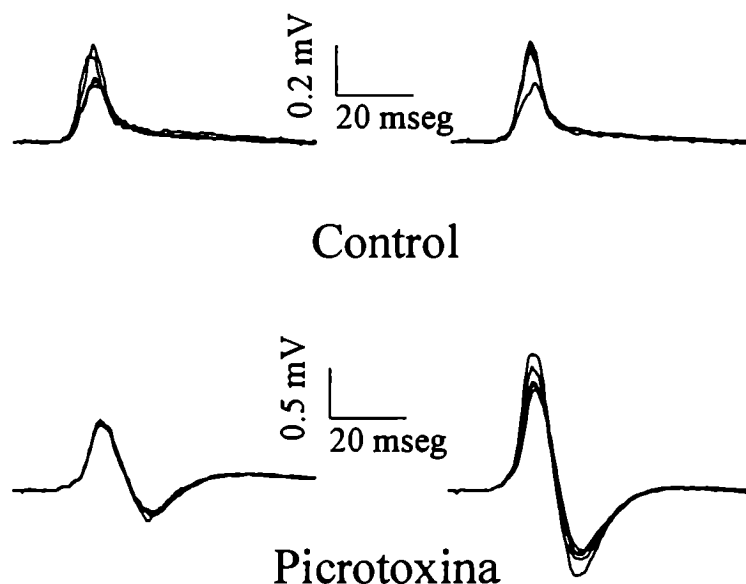


Figura 49. Facilitación de la inducción de potenciación post-tetánica por picrotoxina. Arriba: experimento en solución normal. Abajo: se perfundió picrotoxina $50 \mu\text{M}$. A la izquierda se muestran 5 registros superpuestos obtenidos los 5 min previos a la estimulación tetánica. A la derecha se muestran superpuestos 5 registros obtenidos entre los 5 y 10 min después de la aplicación del tren (20 Hz, 5 seg) la intensidad del estímulo fue submáxima en todo el experimento y la frecuencia de estimulación basal fue de 0.017 Hz.

En la Figura 50 se observan los resultados obtenidos en este grupo de experimentos y se puede ver que en presencia de picrotoxina, aplicada al baño a $t = 5$ min, la amplitud de la señal no se modifica durante la transmisión por estimulación a baja frecuencia (0.017 Hz). En contraste en presencia de la droga la estimulación tetánica (a $t = 35$ min) produjo una potenciación significativamente mayor que en ausencia de la misma. Dado que en estas condiciones la potenciación mostró un decaimiento menos marcado (Fig. 50A), los datos fueron también graficados en forma de histogramas (Fig. 50B) construidos con los datos obtenidos (a, Fig. 50B) o después (d, Fig. 50B) de la estimulación tetánica.

Podemos concluir entonces que, dado que la picrotoxina facilita la inducción de LTP, es posible que durante la estimulación tetánica de alguna manera se active la liberación de GABA ganglionar y que éste actúe inhibiendo la inducción de potenciación a través de receptores similares (sensibles a picrotoxina) a los que activa el GABA exógeno.

Dada la efectividad de la picrotoxina para antagonizar el efecto inhibitorio del GABA exógeno sobre la transmisión y para facilitar la inducción de LTP (presumiblemente bloqueando la inhibición por GABA endógeno), decidimos estudiar el efecto de esta droga sobre la transmisión ganglionar evocada durante la estimulación de la presinapsis a alta frecuencia.

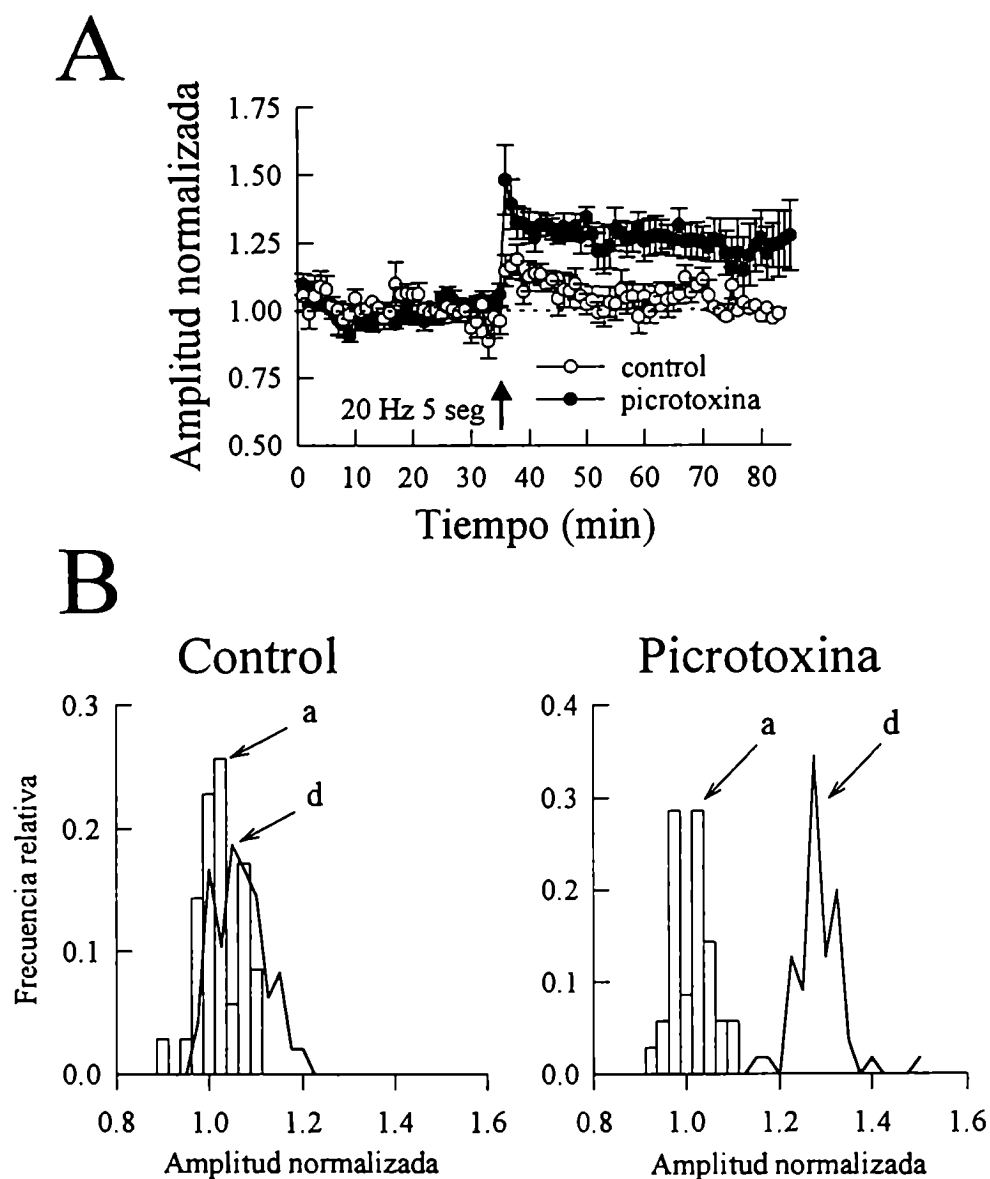


Figura 50. Facilitación de la inducción de LTP por picrotoxina. (A) La picrotoxina ($50 \mu\text{M}$) se aplicó a través del medio de perfusión desde el minuto 5 en adelante. A los 35 min, se aplicó el tren de estimulación tetánica de 5 seg a 20 Hz (flecha). Se muestran medias \pm e.s. de 5 experimentos control (círculos blancos) y 5 en los que se aplicó picrotoxina (círculos negros). (B) Los datos usados para la Fig. 48A se grafican en forma de histograma de frecuencias relativas para los experimentos control (izquierda) y con picrotoxina (derecha). En ambos caso, el histograma de barras corresponde a las señales obtenidas antes (a) y el de líneas después (d) de la estimulación tetánica (20Hz, 5 seg). La frecuencia de estimulación basal fue de 0.017 Hz.

Cuando se estudia el curso temporal de la transmisión durante la estimulación del nervio preganglionar con 10 pulsos (0.5 mseg de duración cada uno) a 20 Hz, es decir la frecuencia utilizada para la inducción de LTP, se observa una disminución progresiva de la amplitud del PAC registrado en el NCI (Figura 51A1). Este decaimiento "intratren" de la transmisión en el GCS por estimulación a frecuencias mayores a 1 Hz ha sido descrito previamente (Zhang y col., 1991) y parece estar debido a varios factores, algunos de los cuales han sido identificados: disminución de la liberación de ACh (McLachlan 1975 citado en Zhang y col., 1991), desensibilización de los receptores nicotínicos (Briggs y col., 1988b) y un efecto inhibitorio de péptidos opioides liberados desde los terminales preganglionares (Zhang y col., 1991, Zhang y col., 1993).

Para probar si la inhibición por GABA es parte de los factores que contribuyen al decaimiento intratren de la transmisión, analizamos el efecto de la picrotoxina en un experimento en el cual para minimizar el efecto de la variación interexperimento, se aplican a la misma preparación dos trenes de 10 estímulos a 20 Hz separados por un intervalo de 30 min y se compara el curso temporal de la transmisión durante cada uno de ellos. En solución externa normal, los efectos de ambos trenes de estímulos (T1 y T2) fueron estadísticamente indistinguibles (Figura 51A2); la aplicación de picrotoxina 100 μ M a través del medio de perfusión 5 min antes y durante T2, no modificó significativamente el curso del decaimiento comparado con el observado durante T1 (Figura 51B1 y B2).

Los resultados de la Figura 51 sugieren que el decaimiento intratren observado no depende de la activación de receptores sensibles a picrotoxina o por lo menos no de los mismos que median la inhibición por GABA exógeno de la transmisión excitatoria durante la estimulación a baja frecuencia o la inhibición de la inducción de LTP.

Cabe aclarar, sin embargo, que la existencia del decaimiento intratren de la transmisión es independiente de la capacidad de inducir LTP; de hecho tanto en nuestras manos como en los experimentos reportados por otros investigadores (Brown y McAfee, 1982, Briggs y col., 1985a, 1988) el decaimiento se observa sistemáticamente durante el protocolo de estimulación tetánica. Una posibilidad es que el decaimiento tenga un componente postsináptico predominante y que por lo tanto no interfiera con la inducción de LTP en la presinápsis. Alternativamente el decaimiento podría deberse a un fenómeno presináptico (por ejemplo, agotamiento del pool liberable de transmisor) pero situado "por detrás" del mecanismo involucrado en la inducción de potenciación que es afectado por GABA.

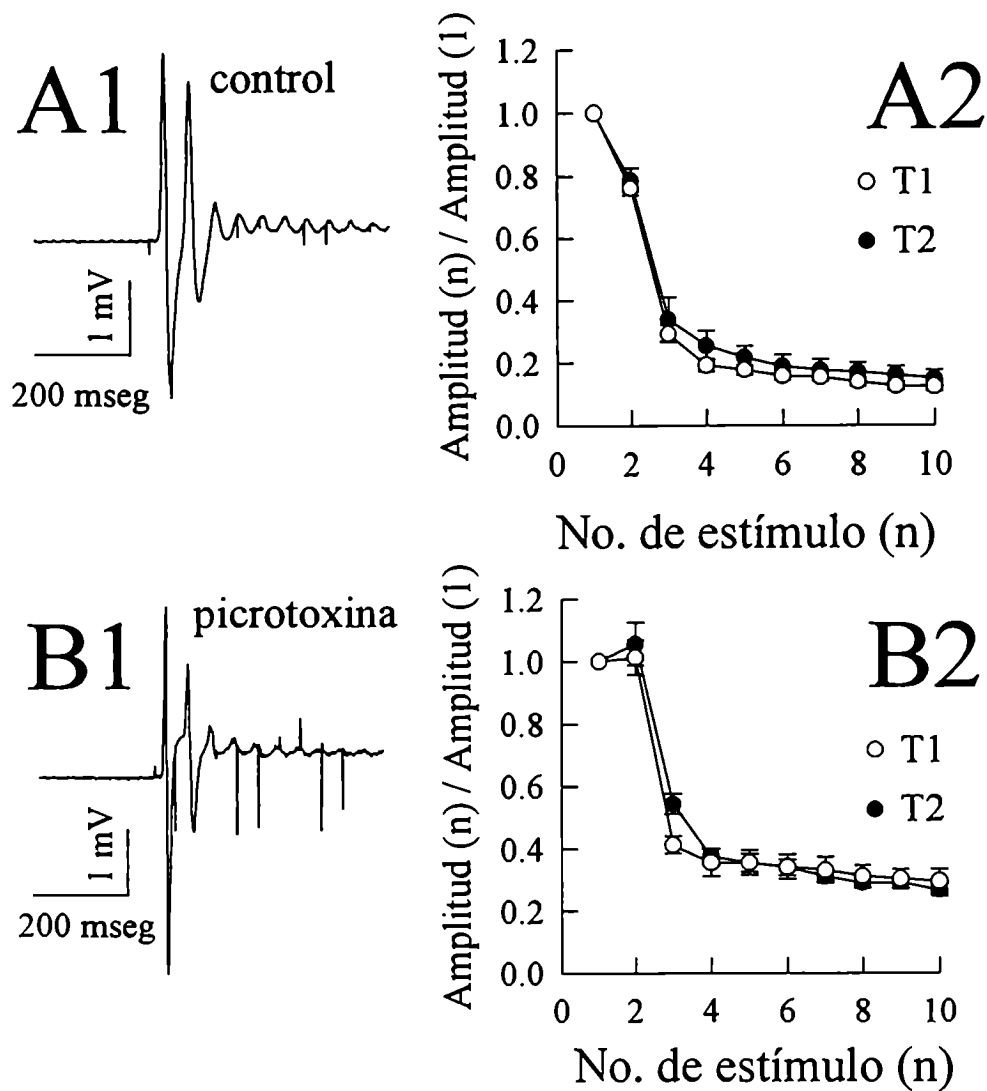


Figura 51. Efecto de la picrotoxina sobre el decaimiento de la transmisión ganglionar durante la estimulación preganglionar a alta frecuencia. Se aplicaron ó dos trenes (T1 y T2) de 10 pulsos a 20 Hz separados 30 min. En A T1 y T2 ambos en solución normal, en B T2 despues de 5 min de perfusión con picrotoxina 100 μ M. La amplitud de las 10 señales registradas en respuesta a cada tren se normalizó respecto al primer PAC dentro del tren.

PARTE 3: Papel del GABA en la fisiología del GCS: estudio de su participación en la expresión de ritmicidad circadiana

3.1. Variaciones horarias en la síntesis de GABA y efecto sobre la liberación de ACh.

La importancia de la inhibición mediada por neuronas GABAérgicas en el procesamiento de la información en las distintas regiones de la corteza cerebral es ampliamente reconocida (Mody y col., 1994). En el hipotálamo, la abundancia de neuronas que usan GABA como transmisor es relativamente alta. En particular en el NSQ hipotalámico la gran mayoría de las células son GABAérgicas (Moore y Speh, 1993) y un gran número de evidencias sustentan la idea de que, aunque la actividad oscilatoria intrínseca de las neuronas de este núcleo no requiere transmisión sináptica química (van den Pol y Dudek, 1993; Bouskila y Dudek, 1993), la transmisión GABAérgica es de gran importancia para la modulación de la génesis de muchos de los ritmos biológicos circadianos.

Además de estar aparentemente involucrado en la regulación de los ritmos circadianos a nivel del NSQ, el GABA parece también participar en la modulación circadiana de la actividad cortical. La síntesis (mediada por la descarboxilasa del ácido glutámico) y el "turn-over" de GABA en la corteza cerebral de roedores varían en forma circadiana (Kanterewicz y col., 1993; Rosenstein y Cardinali, 1990), la unión del GABA y moduladores alostéricos a los receptores GABA_A y el flujo de Cl⁻ activado por GABA también muestran variaciones horarias (Rosenstein y Cardinali, 1990). Una hipótesis atrayente (Rosenstein y Cardinali, 1990) postula que estos cambios circadianos en la función GABAérgica pueden estar mediados por la hormona pineal melatonina que, como mencionáramos, se secreta siguiendo un patrón circadiano (con máximo nocturno) que es controlado por el NSQ a través de una vía neural que incluye al GCS (Binkley, 1983; Reiter, 1991). Al menos una parte de las acciones de esta hormona sobre el sistema nervioso parecen producirse a través de la modulación de la transmisión GABAérgica (Golombek y col., 1992).

Dado que el sistema simpático en general y el GCS en particular parecen estar involucrados en la expresión de la actividad rítmica observada en algunos efectores autonómicos (Binkley, 1983; Romeo y col., 1986; Bar-Ilan, 1984; Siaud y col., 1994; Carter, 1990), decidimos analizar si la información aferente al GCS desde el reloj circadiano puede modular la actividad GABAérgica en una forma similar a como lo hace a nivel cortical. Con ese objeto, algunos parámetros relacionados con la función del GABA fueron estudiados en ganglios obtenidos de animales sacrificados a distintos horarios de ciclo luz:oscuridad diario.

En primer lugar se evaluó la actividad de la enzima glutamato descarboxilasa (GAD). Mencionamos antes que en el GCS y otros ganglios simpáticos otros investigadores detectaron la presencia de esta enzima mediante técnicas de inmunohistoquímica usando anticuerpos que reconocen a las formas de la enzima que se expresan en el SNC (Kenny y Ariano, 1986; Happolla y col., 1987). La detección mediante técnicas bioquímicas en cambio, está menos documentada inclusive se ha reportado que esta actividad enzimática es indetectable en los ganglios simpáticos (Nagata y col., 1966; Kanazawa y col., 1976).

Usando una metodología previamente validada en nuestro laboratorio para estudiar la actividad GAD en el SNC (ver materiales y métodos), que se basa en medir la descarboxilación de 1-¹⁴C-glutamato en presencia de fosfato de piridoxal, en nuestras condiciones experimentales pudimos detectar la conversión de ¹⁴C-glutamato en GABA (Figura 52A) por homogenatos de GCS. Cuando se comparó la capacidad de sintetizar GABA a partir de ¹⁴C-glutamato en homogenatos de ganglios obtenidos a distintos horarios del ciclo Luz

Oscuridad, en las condiciones experimentales usadas no se observaron variaciones significativas en función del horario de sacrificio (Figura 52B). Cabe aclarar que al usar concentraciones subsaturantes de sustrato, aunque la sensibilidad del método

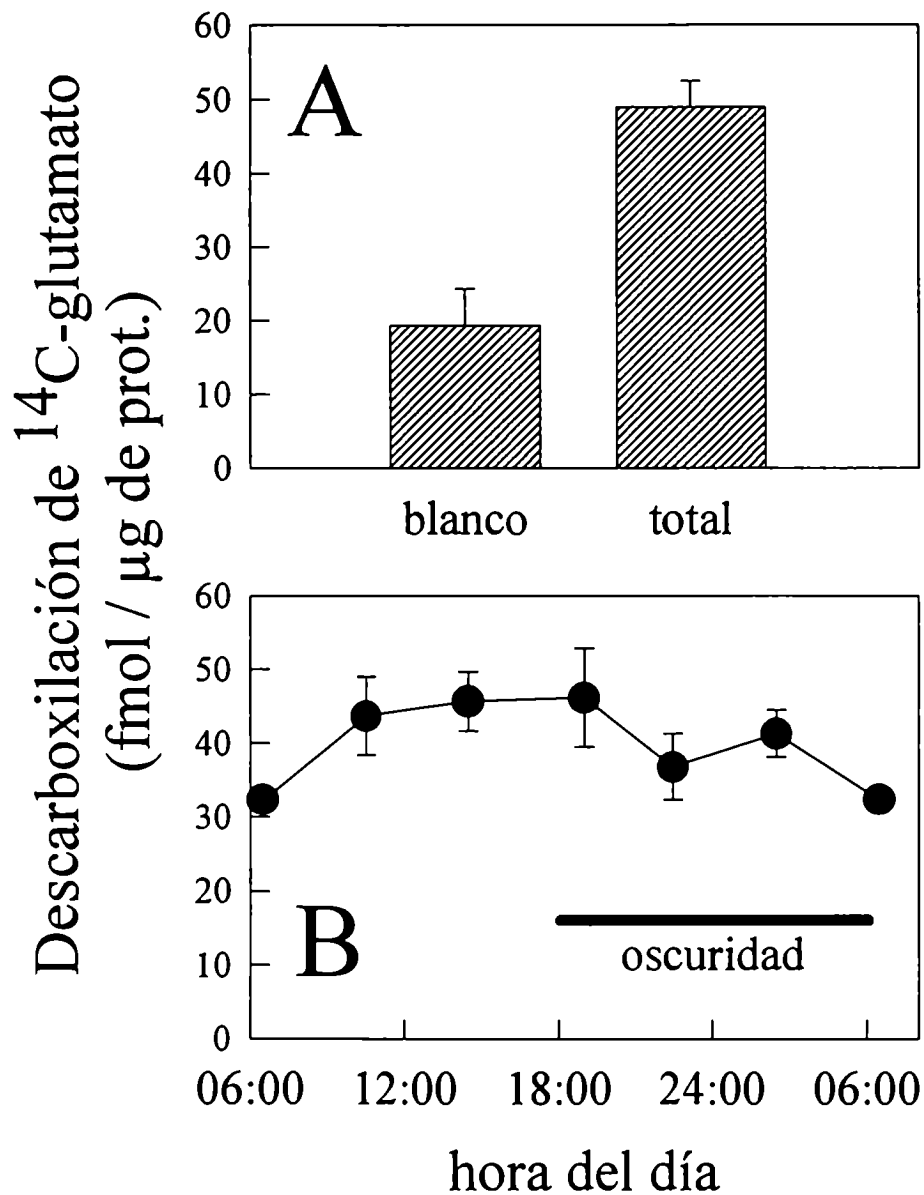


Figura 52. Conversión de glutamato en GABA mediada por la GAD, variación en función del horario. (A) Se muestran resultados de un experimento representativo (determinaciones por duplicado), comparando la descarboxilación de glutamato en el homogenato total y en el blanco de la reacción. (B) Se grafica la descarboxilación de ^{14}C -Glutamato en función del horario en que se sacrificaron los animales para obtener el homogenato de de GCS, se muestran medias \pm e.s., n = 5 a 8. La barra negra muestra la fase de oscuridad.

aumenta en cuanto a detección del producto de la reacción, ciertas condiciones de cambio en la actividad enzimática pueden no ser advertidas.

Tampoco se observaron diferencias en función del horario de sacrificio en la liberación de ^3H -GABA que se produce en respuesta a la elevación de la $[\text{K}^+]_e$, como se observa en la Tabla 7. Es decir que por lo menos desde el punto de vista de estos dos parámetros "presinápticos" (capacidad de sintetizar GABA y respuesta a la despolarización por K^+), no pudimos verificar la existencia de variaciones horarias en la función GABAérgica ganglionar.

Tabla 7. Variación día - noche de la liberación de ^3H -GABA evocada por K^+ 20 mM

horario	liberación suprabasal de ^3H -GABA
12:00	0.25 ± 0.08
19:00	0.19 ± 0.05

Se analizó en dos horarios distintos del ciclo luz : oscuridad, la liberación de ^3H -GABA evocada por K^+ 20 mM de acuerdo a lo descrito en materiales y métodos. Se muestran las medias \pm e.s. de la liberación suprabasal medida en cuatro experimentos para cada horario. Los animales en el bioterio estuvieron bajo un fotoperíodo de 12: 12 L O, con encendido de las luces a las 06:00.

Una posibilidad es que las variaciones horarias se manifiesten únicamente en la actividad "postsináptica" (activación de receptores) del GABA, a diferencia de lo que se observa en la corteza cerebral, donde las variaciones circadianas se observan tanto a nivel pre como postsináptico (Rosenstein y Cardinali, 1990). Para probar esta posibilidad examinamos, en GCS obtenidos a diferentes horarios, la inhibición por GABA (500 μM) de la liberación de ^3H -ACh evocada por elevación de la $[\text{K}^+]_e$. Como se observa en la Figura 53A, la liberación de ^3H -ACh evocada por alto K^+ mostró por sí misma, cambios significativos en función de la hora del día. En particular, la respuesta al $[\text{K}^+]_e$ fue mayor durante la primera mitad de la noche, con valores máximos hacia la primera hora siguiente a la transición luz : oscuridad (19:00 hs). En contraste, independientemente de los cambios diarios en la liberación suprabasal de ^3H -ACh inducida por K^+ , el efecto inhibitorio del GABA no evidenció una variación horaria significativa (Figura 53A y B), manteniéndose aproximadamente en un 30-35 % para todos los horarios (Fig. 53B).

Estos resultados indican que tampoco la respuesta al GABA varía en función del horario sugiriendo entonces que, si el GABA participa en el procesamiento de información circadiana a nivel ganglionar este rol no puede ponerse en evidencia a través de los parámetros aquí analizados.

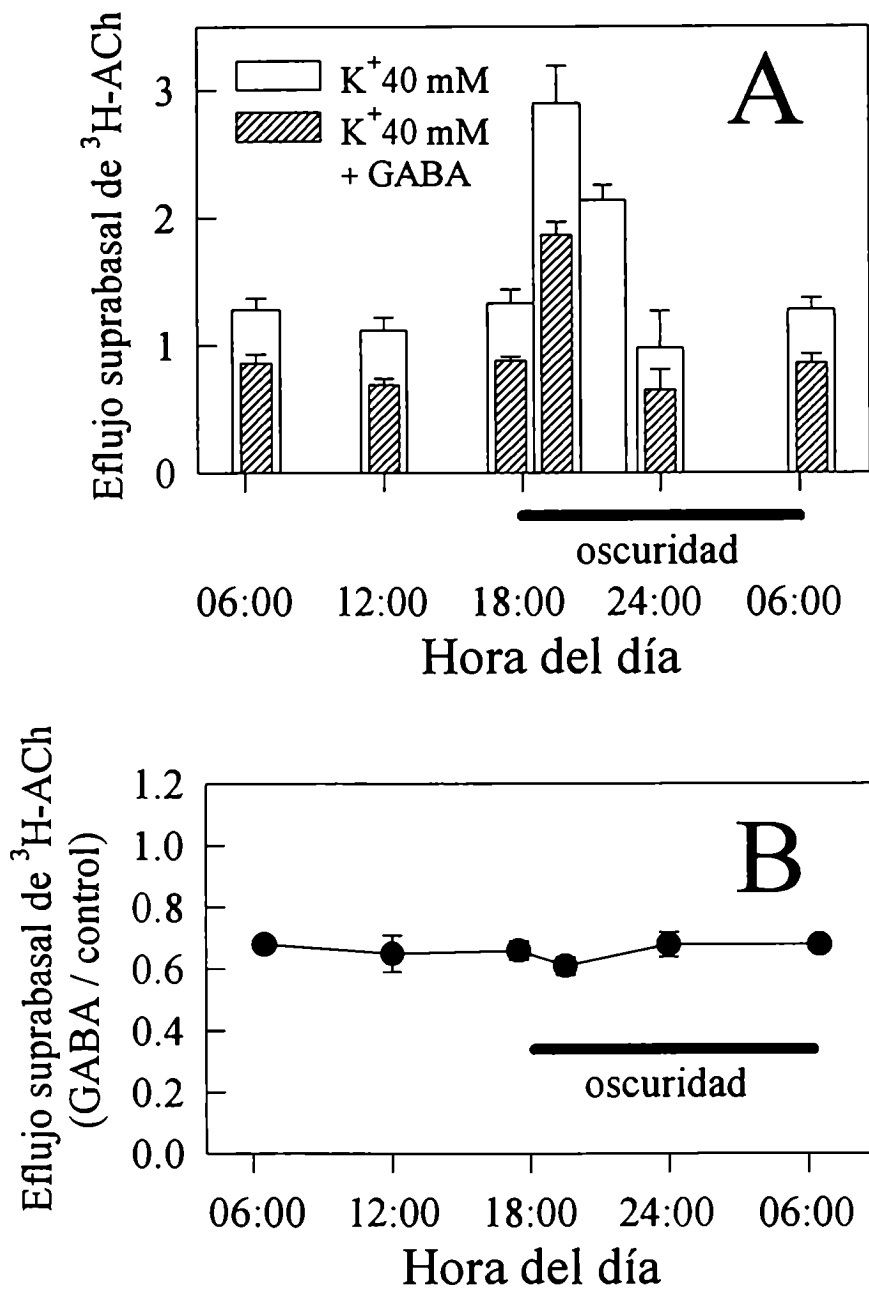


Figura 51. Variación horaria de la inhibición por GABA (500 μ M) de la liberación de ³H-ACh evocada por K⁺ 40 mM. (A) Se grafican, en función del horario de sacrificio, las medias \pm e.s. (K⁺, n = 9; K⁺ + GABA, n = 5) de la liberación suprabasal en respuesta al K⁺ en presencia o ausencia de GABA 500 μ M. No se analizó el efecto del GABA a las 24:00 hs. (B) Se grafica el cociente entre la respuesta al K⁺ con y sin GABA en 5 experimentos de los mostrados en (A) donde se estudiaron secuencialmente ambas respuestas en la misma preparación (K⁺ \rightarrow K⁺+GABA). Se muestra medias \pm e.s. (n = 5). La barra negra muestra la fase de oscuridad.

3.2 Variaciones horarias en parámetros colinérgicos.

Independientemente de la falta de variación horaria en parámetros neuroquímicos relacionados a la función del GABA, los resultados expuestos en la Figura 53 muestran, hasta donde sabemos por primera vez, que la actividad colinérgica presináptica en el GCS exhibe una variación horaria significativa, por lo cual consideramos interesante estudiar esta variación desde algunos aspectos adicionales. En la Figura 54A se grafican los resultados obtenidos al

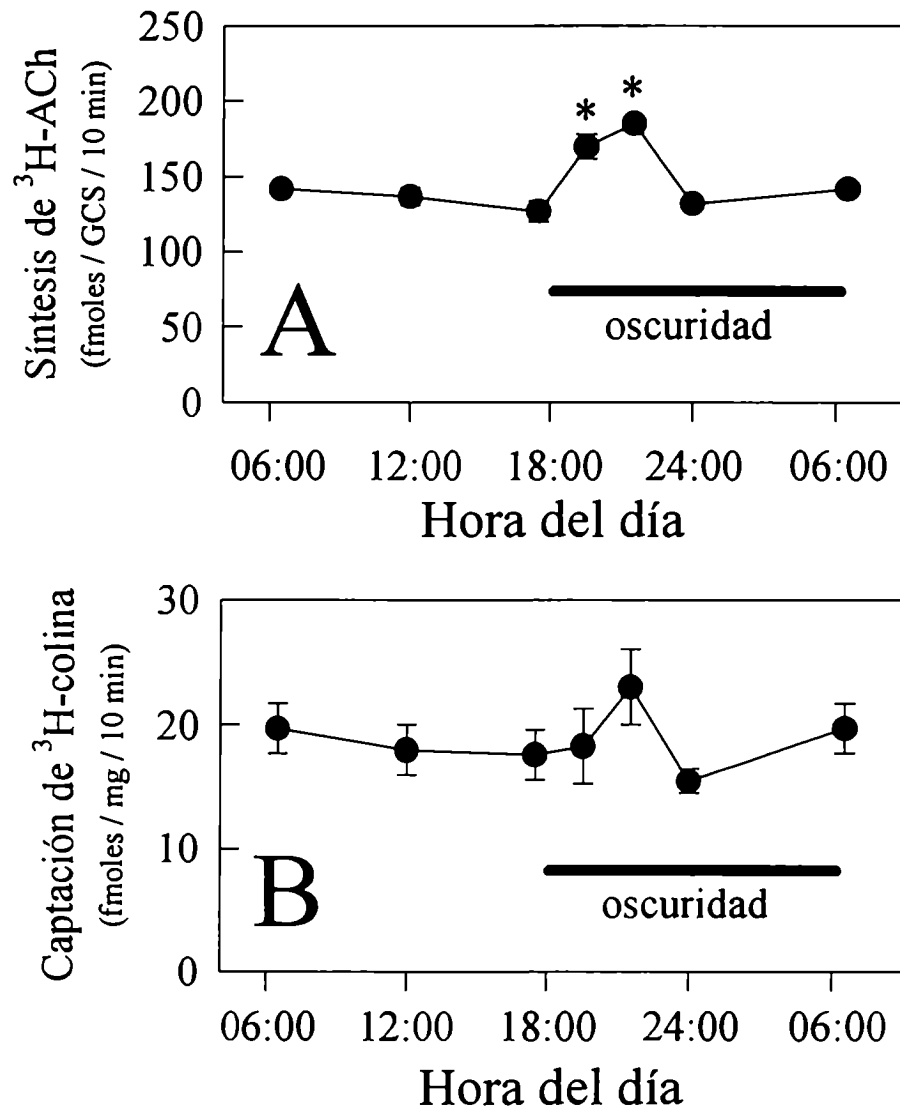


Figura 54. Variación horaria en el síntesis de ACh (A) por homogenatos de GCS y en la captación de ³H-colina (B) por el GCS intacto. Los parámetros se midieron de acuerdo a los descrito en Materiales y Metodos, en GCS obtenidos de animales sacrificados en los horarios indicados. * : $p < 0.05$ versus 18:00 ó 24:00 hs. , ANOVA, test de Tukey.

estudiar en los mismos puntos horarios anteriores la capacidad de homogenatos de GCS para sintetizar $^3\text{H-ACh}$ a partir de $^3\text{H-colina}$.

Como se observa, este parámetro mostró una variación con curso horario similar, aunque la diferencia entre los valores bajos obtenidos en horas del día y los valores máximos obtenidos durante la primera mitad de la noche fue en este caso significativamente menor. En contraste, la captación de $^3\text{H-colina}$ sensible a hemicolinio-3 ($25 \mu\text{M}$), no mostró ninguna variación horaria evidente, pero este último resultado debe ser interpretado con precaución ya que como fue mostrado en este trabajo de Tesis (ver Fig. 19) este parámetro no es afectado por la desnervación preganglionar, a diferencia de la síntesis de $^3\text{H-ACh}$ a partir de $^3\text{H-colina}$ y de la liberación de $^3\text{H-ACh}$ evocada por K^+ alto (ver Figs. 19 y 25, respectivamente).

Para probar si los aumentos observados en la liberación y síntesis de ACh durante la primera mitad de la noche son la simple consecuencia de la exposición a la oscuridad después de la transición, grupos de animales tomados en horas del día (11:00 hs) fueron expuestos en forma aguda a oscuridad durante 1.5 horas, luego de lo cual se sacrificaron para obtener el GCS y se analizaron los parámetros colinérgicos mencionados anteriormente.

Los resultados obtenidos se muestran en la Tabla 8, donde se puede ver que la exposición a oscuridad en forma aguda no tiene efecto significativo, comparando con tejido obtenido de animales control, mantenidos en su régimen de iluminación normal. Estos resultados son compatibles con que la variación horaria observada se deba a un verdadero mecanismo circadiano, aunque la verificación final debe ser realizada estudiando estos mismos parámetros en GCS de animales mantenidos en libre curso ("free running").

Tabla 8 Efecto de la exposición aguda a la oscuridad por 1.5 hs. a las 11:00 sobre la actividad colinérgica in vitro en el GCS.

grupo experimental	liberación suprabasal de $^3\text{H-ACh}$	síntesis de $^3\text{H-ACh}$ (fmoles/GCS/10 min)
control	1.40 ± 0.09	124 ± 12
expuestos a oscuridad	1.29 ± 0.10	139 ± 14

Los parámetros mencionados se midieron de acuerdo a lo descrito en materiales y métodos en GCS obtenidos de animales mantenidos en condiciones de iluminación normal es decir 12:12 L : O (grupo control) ó sometidos a un periodo de 1.5 hs. de oscuridad a partir de las 11:00 hs (expuestos a oscuridad). En ambos grupos los animales fueron sacrificados a las 12:30 hs.

Una posibilidad que surge a partir de estos resultados es que el aumento nocturno de la liberación y síntesis de $^3\text{H-ACh}$ esté relacionado con una mayor actividad presináptica (frecuencia de disparo de potenciales de acción) en los terminales preganglionares en los momentos previos al sacrificio durante la noche.

Durante los periodos de actividad presináptica sostenida, en los terminales colinérgicos del GCS se activan (de alguna manera no del todo comprendida) los mecanismos destinados a

reponer el transmisor liberado (Collier y Katz, 1974; Sacchi y col., 1979); cuando la actividad se interrumpe, la activación de esos mecanismos persiste por varios minutos en el período de reposo siguiente, de manera tal que la aplicación de ^3H -colina en este momento permite una marcación eficiente del "pool" liberable de ACh y por lo tanto una mayor liberación de ^3H -ACh por los ganglios previamente estimulados (Collier y Katz, 1974; Sacchi y col., 1979).

Para evaluar la posibilidad de que las diferencias noche-día observadas en nuestras condiciones experimentales se deban a un fenómeno de este tipo, se obtuvieron ambos GCS de animales sacrificados en horas del día (11:00-12:00 hs). uno de ellos fue estimulado eléctricamente in vitro por 20 min a 5 Hz, mientras que el contralateral se dejó en reposo y sirvió como control. Inmediatamente después de terminada la estimulación eléctrica ambos ganglios fueron preparados para estudiar la liberación de ^3H -ACh evocada por alta $[\text{K}^+]_e$ u homogeneizados en buffer frío para determinar la síntesis de ^3H -ACh en forma idéntica a lo realizado durante el experimento donde se estudió la variación horaria de estos parámetros.

La Tabla 9 muestra que la liberación suprabasal de ^3H -ACh evocada por $[\text{K}^+]_e = 40$ mM fue significativamente mayor en los GCS con estimulación presináptica previa que en los que fueron dejados en reposo. Con este protocolo de estimulación (20 min a 5 Hz), la liberación suprabasal de ^3H -ACh por ganglios previamente estimulados fue unas tres veces mayor, diferencia básicamente igual a la que existe entre ganglios obtenidos en la noche (19:00 hs) y en horarios diurnos. En contraste, la conversión de ^3H -colina en ^3H -ACh por los homogenatos no fue afectada significativamente por la estimulación previa (Tabla 9).

Tabla 9. Efecto de la estimulación eléctrica previa sobre la liberación y síntesis de ^3H -acetilcolina en el GCS.

Grupo experimental	Liberación de ^3H -acetilcolina inducida por K^+	Síntesis de ^3H -acetilcolina (fmoles/GCS/10 min)
no estimulados	1.20 ± 0.21	167 ± 16
estimulados (20 min a 5 Hz)	$3.52 \pm 0.54 *$	150 ± 21

Ambos GCS de animales sacrificados a las 12:00 (en ciclo 12:12, luces encendidas a las 06:00) fueron colocados en una cámara de registro electrofisiológico. Mediante un electrodo y un estimulador, uno de ellos fue sometido a estimulación eléctrica del tronco preganglionar (20 min a 5 Hz) el GCS contralateral fue dejado en reposo y se usó como control. Inmediatamente después del período de estimulación eléctrica los dos ganglios fueron procesados para la determinación de la liberación o la síntesis de ACh. Se muestran medias \pm e.s. (n = 3). * $P < 0.05$ versus no estimulados, test t de Student.

Los resultados indican entonces que la actividad presináptica previa puede explicar sólo parcialmente las diferencias horarias observadas en la actividad colinérgica ganglionar; ya que sólo la capacidad de liberar ^3H -ACh en respuesta a la alta $[\text{K}^+]_e$ aumenta por la estimulación preganglionar. Estos resultados muestran que no es estrictamente necesario el aumento de la capacidad de síntesis de ACh para poder observar una mayor liberación de ^3H -ACh tras la incubación con ^3H -colina, por lo cual no es claro que las variaciones horarias similares halladas para ambos parámetros estén relacionadas.

Es posible que la actividad preganglionar in vivo, que se supone aumenta durante la noche temprana, produzca una forma distinta de aumento de la liberación del transmisor (sí relacionada con un aumento de la capacidad de síntesis) debida a la presencia de algún factor ausente durante la estimulación in vitro.

DISCUSION

Antes de comenzar con la discusión de los resultados presentados, resumiremos brevemente los principales hallazgos experimentales obtenidos en este trabajo:

1) Hemos estudiado desde varios aspectos los mecanismos de transporte de GABA en el GCS. En base a la afinidad por el aminoácido, se detectaron al menos dos sistemas que denominamos de alta y baja afinidad. El transporte de GABA en el GCS fue sensible al 2,4-DABA, β -alanina y al ácido nipecótico, inhibidores de los transportadores neuronales, gliales, o de ambos, respectivamente. La captación no fue alterado por la desnervación preganglionar crónica.

2) Se estudió la capacidad del GCS para liberar GABA en respuesta a la despolarización. El eflujo de GABA evocado por alta $[K^+]_e$ o por veratrina presentó un componente (o fue totalmente) independiente de la presencia de Ca^{2+} extracelular. Inhibidores de los transportadores de GABA (2,4-DABA, β -alanina y al ácido nipecótico) que son ellos mismos transportables, provocaron un aumento del eflujo espontáneo de 3H -GABA. El 3H -GABA acumulado en presencia de β -alanina se liberó, en respuesta al K^+ alto, con mayor facilidad que el acumulado en presencia de 2,4-DABA. La liberación inducida por alta $[K^+]_e$ no se afectó por la desnervación preganglionar crónica.

3) La aplicación de GABA exógeno provocó una inhibición neta de la transmisión ganglionar estudiada mediante registros electrofisiológicos extracelulares. Este efecto parece estar mediado predominantemente por receptores tipo $GABA_A$ sensibles a muscimol, picrotoxina y bicuculina. Con perfusiones prolongadas y a las concentraciones mas altas, la respuesta presentó desensibilización.

4) La aplicación de GABA exógeno inhibió la inducción de potenciación de la transmisión por estimulación preganglionar repetitiva. Este efecto, mediado por receptores tipo $GABA_A$ sensibles a muscimol y picrotoxina, fue mayor cuando el GABA se aplicó coincidentemente con la estimulación repetitiva y también se observó al aplicar GABA en los minutos siguientes a la estimulación tetánica. La aplicación de picrotoxina (sin GABA) facilitó la inducción de potenciación por un protocolo de tetanización que en su ausencia produce potenciación submáxima o no produce potenciación.

5) No se observaron variaciones significativas, en función del horario, en el efecto inhibitorio del GABA sobre la liberación de ACh, en la actividad glutamato descarboxilasa, o en el contenido de GABA del GCS.

Se describió por primera vez la existencia de una variación horaria en la liberación de ACh inducida por K^+ .

El objetivo general del presente trabajo de Tesis fue aportar evidencias neurofarmacológicas acerca de la posible función del GABA en el GCS. La hipótesis de que el GABA funcione como mensajero intercelular en la periferia, tanto en tejidos neurales como no neurales, está en la actualidad ampliamente aceptada (Erdo, 1985; Erdo y Bowery, 1986; Erdo y Wolff, 1990). Sin embargo, hasta que se describió la presencia de neuronas y terminales nerviosos inmunopositivos para GABA, la validez de esta idea no fue considerada para el caso del GCS (Bowery y Hill, 1986). En este sentido, pudimos obtener evidencias de que algunos de los componentes básicos de un sistema de comunicación mediada por GABA, están presentes en el GCS de la rata.

Mediante metodologías neuroquímicas, pudimos describir la presencia de transportadores para GABA en este tejido. Como ya hemos mencionado, la presencia de sistemas de transporte se presume de gran importancia para la función del GABA como transmisor (Amara 1993, Lester y col., 1994).

Clásicamente, se asignó un rol preponderante para los transportadores de alta afinidad (Erecinska, 1987; Wood y Sidhu, 1987) asumiendo que esta propiedad fuese necesaria para la adecuada terminación de la acción sináptica del GABA (Krnjevic, 1984). Actualmente este rol puede discutirse, debido a que en muchos casos los bloqueantes del transporte no producen efecto alguno sobre los potenciales sinápticos (monosinápticos) mediados por GABA (Mody y col., 1994). Esta y otras evidencias llevaron a la hipótesis de que el curso temporal de la acción sináptica del GABA esté determinado sólo por la difusión del transmisor en el espacio sináptico (Mody y col., 1994).

Por otra parte, si bien al presente no se cuenta con demasiados datos experimentales, las estimaciones disponibles sobre la concentración que alcanzan los transmisores aminoacídicos (Clements y col., 1992; Machonochie y col., 1994) y el GABA en particular (Machonochie y col., 1994; Mody y col., 1994) en la brecha sináptica, sugieren que la misma llega a valores en el orden mM (0.5 a 1.2 mM). Tomando en cuenta esta información se puede concluir que un sistema de captación de alta afinidad puede inclusive saturarse y perder parte de su eficiencia para la remoción del GABA extracelular.

Se ha propuesto que en vez de terminar la acción sináptica del GABA los sistemas de captación pueden funcionar limitando la difusión espacial del transmisor desde las sinapsis activas hacia receptores de otras sinapsis o extrasinápticos (Isaacson y col., 1993).

El análisis cinético de la captación de GABA realizado en este trabajo, sugiere que en el GCS intacto existen posiblemente dos sistemas de transporte, tanto de alta ($K_m \sim 20 \mu M$) como de baja ($K_m \sim 200 \mu M$) afinidad. Nuestros resultados no nos permiten discernir si se trata de un único transportador que alterna entre dos estados de distinta afinidad. Tampoco podemos extraer conclusiones sobre la ubicación espacial de estos dos sistemas de transporte, una posibilidad es que se encuentren localizados diferencialmente, de acuerdo a la concentración de transmisor que "ven" en condiciones fisiológicas, la cual se puede suponer mayor en la cercanía de las sinapsis GABAérgicas.

En nuestras condiciones experimentales, la acumulación de GABA por GCS intactos aislados fue sensible al efecto de varios inhibidores farmacológicos de los transportadores para este aminoácido. Según la interpretación clásica, algunos de estos inhibidores permiten distinguir entre acumulación glial o neuronal (β -alanina y 2,4-DABA, respectivamente) (Iversen y Kelly, 1975; Schousboe y col., 1979).

El clonado y expresión funcional recientes de varios (al menos tres) transportadores específicos para GABA (Guastella y col., 1991; Borden y col., 1992; Clark y col., 1992; Corey

y col., 1994) ha permitido confirmar que los transportadores con perfil farmacológico tipo glial (sensibilidad preferencial a β -alanina) o neuronal (sensibilidad preferencial a 2,4-DABA) existen como entidades moleculares separadas.

Cualitativamente, nuestros resultados sugieren que en el GCS se expresan transportadores similares a estos dos tipos mencionados. Desde un punto de vista cuantitativo, las CI_{50} obtenidas en este trabajo para los dos inhibidores están dentro del rango de valores reportados previamente en otras preparaciones (Schousboe y col., 1979; Borden y col., 1992; Corey y col., 1994); por otra parte el efecto máximo aparente del 2,4-DABA y la β -alanina fue similar, por lo cual es difícil interpretar cuánto aporta cada componente al transporte total. De hecho, algunos de los transportadores clonados son inhibidos (aunque con potencia diferente) tanto por 2,4-DABA como por β -alanina (Guastella y col., 1990; Borden y col., 1992), por lo cual es complicado distinguir en base a la farmacología la presencia de transportadores múltiples en el tejido intacto del GCS.

Las evidencias recientes indican que existe una diversidad de transportadores de GABA mayor que la supuesta previamente y es probable que esto conduzca a una reinterpretación de la farmacología clásica del transporte de GABA. Por ejemplo, hay datos que indican que los transportadores β -alanina-sensibles pueden expresarse también en neuronas y no exclusivamente en la glía (Clark y col., 1992).

Dado que el tejido de este ganglio simpático parece ser particularmente apto para la realización de experimentos histoquímicos, queda abierta la posibilidad de estudiar por inmunocitoquímica o hibridación molecular la expresión de estas proteínas por distintos tipos celulares del GCS.

El transporte neuronal de GABA se asocia por lo general con la recaptación por los terminales desde donde se libera y con la posibilidad de que sea reutilizado como transmisor. El GABA captado por la glía puede ser transformado en glutamina, molécula que puede difundir libremente entre células y entrar en distintas vías metabólicas, incluyendo su reconversión en GABA. El GABA captado por la glía también puede ser liberado desde ellas y actuar sobre otras células (Barres, 1991).

En este trabajo obtuvimos evidencias de que el GABA que se acumula por el GCS intacto, lo hace en compartimentos desde donde se puede liberar en respuesta a la despolarización. La elevación del K^+ en el medio de perfusión provocó un aumento de la liberación de GABA en forma Ca^{2+} -dependiente (K^+ 20 mM) y también Ca^{2+} -independiente (K^+ 50 mM).

La liberación inducida por K^+ 20 mM disminuyó en ausencia de Ca^{2+} externo o en presencia de verapamil, droga que pertenece a la familia de las difenil-alquilaminas y que entre otros efectos actúa como bloqueante de los canales de Ca^{2+} voltaje-dependientes de tipo L (Bertolino y Llinas, 1992). Aunque se acepta que los canales de Ca^{2+} asociados a la liberación rápida de transmisor son los de tipo N y/o P (Dunlap y col., 1995) se ha propuesto que los canales L están acoplados a la liberación lenta y "masiva" (Artalejo y col., 1994; Johnston y Wu, 1995) como la que se espera obtener por despolarización sostenida con alto K^+ .

En forma similar a lo que se observa en la sinapsis neuromuscular, en los terminales colinérgicos del GCS el aumento del K^+ externo produce un aumento Ca^{2+} -dependiente de la liberación del transmisor incrementando la frecuencia de eventos de liberación espontánea (Sacchi y Perri, 1976). Por cual podría suponerse que la liberación de GABA evocada por K^+

20 mM, siga un mecanismo similar. En este sentido, es pertinente notar sin embargo que en el SNC se ha reportado la presencia de potenciales miniatura debidos a la liberación cuántica de GABA independiente del Ca^{2+} extracelular (Collingridge y col., 1984; Otis y Mody, 1992 citados en Mody y col., 1994, Scanziani y col., 1992).

¿Cuál es la posible diferencia entre la liberación evocada por K^+ 20 mM y la evocada por K^+ 50 mM, que es totalmente Ca^{2+} -independiente? Tal como discutimos brevemente en la sección de resultados, una interpretación posible para la liberación Ca^{2+} -independiente es que la despolarización active un mecanismo de eflujo de GABA mediado por transportador. Aunque estructuralmente los transportadores son asimétricos (Levi y Raiteri, 1993), un gran número de datos experimentales muestra que el GABA puede permear a través de ellos en ambas direcciones (Schwartz, 1987; Attwell y col., 1993; Cammack y Schwartz, 1993; Levi y Raiteri, 1993; Cammack y col., 1994; Lester y col., 1994), es decir que pueden operar tanto en dirección de captación como de liberación.

La dirección efectiva en que el GABA es transportado depende de distintos factores, el potencial de membrana es uno de ellos. La despolarización de la membrana favorece la translocación hacia afuera y lo contrario ocurre al potencial de reposo o con la hiperpolarización (Attwell y col., 1993; Lester y col., 1994). Además, la despolarización puede estar asociada a un aumento local y transitorio de la $[\text{Na}^+]_i$, lo cual, dado que el Na^+ es uno de los iones que se co-transportan con GABA, también favorece la salida del aminoácido (Attwell y col., 1993).

Se ha propuesto (Attwell y col., 1993) que, en el equilibrio, esta dependencia con el Na^+ y el potencial de membrana (V_m) puede describirse según:

$$[\text{GABA}]_e = [\text{GABA}]_i \left(\frac{[\text{Na}]_i}{[\text{Na}]_e} \right)^2 \left(\frac{[\text{Cl}]_i}{[\text{Cl}]_e} \right) e^{\{V_m F/RT\}}$$

Por último distintas evidencias sugieren que los transportadores son en sí mismos voltaje-dependientes (Cammack y Schwartz 1993; Lester y col., 1994).

En este trabajo pudimos demostrar que en el GCS la liberación de GABA Ca^{2+} -independiente se evoca despolarizando con K^+ alto o por aplicación de veratrina, droga que activa canales de Na^+ voltaje-dependientes y que en otras preparaciones evoca liberación tanto dependiente como independiente del Ca^{2+} extracelular (Levi y col., 1980; Sihra y col., 1984; Attwell y col., 1993).

Obtuvimos también una prueba adicional, compatible con la idea de que el eflujo mediado por transportador opera en el GCS, y es el hecho de que la aplicación de distintos compuestos que inhiben el transporte de GABA y a la vez son ellos mismos transportados (2,4-DABA, β -alanina y ácido nipecótico) produjeron un aumento del eflujo de ^3H -GABA previamente acumulado por el GCS. Se supone que estas sustancias ingresan en el compartimento de acumulación y se intercambian con el ^3H -GABA, este mecanismo farmacológico de intercambio heterólogo ("heteroexchange") es usualmente asociado a la liberación mediada por transportador (Johnston y col., 1976; Solis y Nicoll, 1992; Levi y Raiteri, 1993).

En general, la "liberación" por intercambio heterólogo no disminuye en ausencia de Ca^{2+} ; en nuestras condiciones experimentales inclusive se vió aumentada. No tenemos una explicación clara para esta " Ca^{2+} -dependencia invertida", una posibilidad es que el ion Ca^{2+} ejerza un efecto inhibitorio sobre la translocación de GABA a través del carrier. Si bien la

influencia de iones monovalentes sobre el transporte de GABA está bastante estudiada (Cammack y Schwartz, 1993; Mager y col., 1994), no hay consenso acerca del efecto del Ca^{2+} .

La falta de Ca^{2+} produce despolarización de las membranas biológicas (Junge, 1992a) lo cual provee otra explicación para el efecto sobre el intercambio: podría ocurrir que dado que el transportador es voltaje-dependiente, el efecto de los inhibidores/sustratos sea mayor en condiciones de despolarización.

Debido a que es claramente antagónica con la clásica hipótesis del Ca^{2+} , la liberación Ca^{2+} -independiente fue considerada o bien como un artefacto experimental debido a la inefectividad del GABA tritiado para marcar el "pool" fisiológicamente relevante de neurotransmisor, o como un mecanismo de liberación hallado exclusivamente en las células de la glia y de dudosa significancia fisiológica.

Dado que una despolarización sostenida por K^+ alto como la usada en nuestros experimentos es una seguramente poco fisiológica, a manera de control de las condiciones experimentales estudiamos en paralelo la liberación de ACh, transmisor para el cual no existen transportadores en la membrana plasmática y cuya liberación es claramente Ca^{2+} -dependiente en todos los paradigmas experimentales estudiados.

En nuestros experimentos, la liberación de ACh medida en las mismas condiciones que la de GABA fue, a diferencia de ésta última, marcadamente dependiente de la presencia de Ca^{2+} extracelular, mostrando que la Ca^{2+} -independencia de la liberación no es el resultado de un artefacto grosero de la metodología utilizada. Una diferencia similar entre la liberación de GABA y ACh fue descrita por Arias y Tapia en sinaptosomas purificados de corteza cerebral de ratón (Arias y Tapia, 1986).

En la actualidad, numerosas evidencias sustentan la idea de que este mecanismo de liberación es fisiológicamente relevante, principalmente en circuitos neurales donde una liberación tónica y lenta, dependiente de cambios graduados del potencial de membrana diferentes del potencial de acción, pueda jugar un rol trascendente (Adam-Vizi, 1992). La retina es un excelente ejemplo y es allí donde se han obtenido las evidencias más claras sobre la importancia funcional de la liberación tónica (por fotorreceptores y células horizontales, Schwartz, 1987; Levi y Raiteri, 1993).

Los resultados discutidos hasta aquí sugieren que el ^3H -GABA se acumula y libera tanto en un compartimento tipo neuronal como tipo glial. Dado que al primero pueden contribuir fibras nerviosas GABA-positivas de neuronas cuyos somas se localizan fuera del GCS, intentamos evaluar esta posibilidad estudiando la captación y liberación de ^3H -GABA por GCS crónicamente separados de su inervación preganglionar, por la cual ingresan al ganglio las mencionadas fibras. Ninguno de los dos parámetros se afectó por esta manipulación, lo cual sugeriría que dependen fundamentalmente de estructuras no afectadas por la desnervación, como neuronas locales que no proyecten por el tronco preganglionar o la glia misma. Sin embargo, estos resultados deben interpretarse con precaución ya que la captación de ^3H -colina tampoco se afectó a pesar de que el grueso de las fibras preganglionares son colinérgicas.

Nuestros resultados también muestran que el ^3H -GABA acumulado en forma insensible a β -alanina, se libera en respuesta al K^+ con mayor facilidad que el 2,4-DABA-insensible. De acuerdo con la farmacología clásica del transporte (2,4-DABA inhibe la captación neuronal y β

-alanina la glial), podría interpretarse que la liberación desde el "pool" neuronal de GABA está mejor acoplada a la despolarización. Anteriormente propusimos una idea similar para explicar la diferencia entre la dependencia con la $[K^+]_e$ de la liberación de ACh (que es enteramente Ca^{2+} -dependiente) y la de GABA (que tiene un componente Ca^{2+} -independiente); podría suceder que en el mecanismo de liberación acoplado al influjo de Ca^{2+} , el efecto de la despolarización se "amplifique" a través de los efectos intracelulares del catión. De ser así, la liberación de GABA acumulado en presencia de β -alanina (en un compartimento neuronal) debería ser en su mayor parte dependiente del Ca^{2+} externo.

Como dijéramos anteriormente, la aplicación de veratrina también fue capaz de evocar liberación de 3H -GABA por el GCS. Asumiendo que el principio activo de esta mezcla de alcaloides sea exclusivamente la veratridina, este resultado indica que la liberación proviene de un reservóreo que responde a agonistas de canales de Na^+ voltaje-dependientes. Sin embargo, dado que la veratrina contiene además otros tres alcaloides (cevadina, cevadillina y sabadina), debería verificarse que el efecto de esta mezcla fuese, por ejemplo, antagonizado por tetrodotoxina (TTX), experimento que no fue realizado como parte de esta Tesis.

De acuerdo con los conceptos clásicos, se asume que las células de la glía carecen de una densidad significativa canales de Na^+ activados por voltaje (Barres, 1991). Bajo esta hipótesis, la liberación inducida por veratrina debería originarse exclusivamente a partir de la despolarización de la membrana neuronal. Como el efecto de la veratrina fue Ca^{2+} -independiente, tal como se demostró en otras preparaciones (Levi y col., 1980; Sihra y col., 1984; Attwell y col., 1993), no es posible hacer una distinción entre liberación originada en glía o neuronas en base a la dependencia respecto del Ca^{2+} externo.

No obstante, si bien la glía en general es inexcitable y en particular lo son también las células gliales en el GCS de ratas adultas (Adams y Brown 1975; Bowery y col., 1979), la inexcitabilidad no implica la ausencia total de canales de Na^+ . En la actualidad un gran número de evidencias muestran que las células gliales pueden expresar varios tipos de canales iónicos activados por voltaje, entre ellos selectivos para Na^+ y sensibles a TTX (Barres, 1991; Murdoch-Ritchie, 1992). La falta de fenómenos regenerativos puede deberse a que los canales de Na^+ se encuentren en una densidad insuficiente para superar la alta conductancia al K^+ que estas células exhiben en reposo (Barres, 1991). Una hipótesis reciente (Murdoch-Ritchie, 1992) propone que los canales iónicos son sintetizados en células gliales para luego ser transferidos a las neuronas. Aun así, su activación masiva y sostenida de los canales gliales por agonistas como la veratridina podría causar una despolarización suficiente como para evocar liberación glial de GABA.

En conjunto, los resultados discutidos hasta este punto sugieren desde un punto de vista cualitativo que en el tejido intacto del GCS existen mecanismos de acumulación y liberación de GABA tanto neuronales como gliales. La liberación por despolarización mostró componerse de mecanismos tanto dependientes como independientes de la presencia de Ca^{2+} en el medio extracelular y pudo ser evocada por despolarización ya sea mediada por K^+ o por un agonista de canales de Na^+ activados por voltaje.

En los circuitos entre neuronas de distintas regiones del SNC, la liberación de GABA desde interneuronas es usualmente disparada por la excitación mediada por glutamato (Nicoll y col., 1990; Attwell y col., 1993; Belhage y col., 1993) e inhibida por el propio aminoácido actuando sobre autorreceptores presinápticos (Nicoll y col., 1990; Davies y col., 1993; Mody y

col., 1994). No está aclarada aún la arquitectura de los circuitos en los que puedan participar las células GABAérgicas en el GCS, de todas maneras en este trabajo intentamos determinar si alguna(s) de las sustancias neuroactivas (que al menos lo son en el sistema nervioso en general) que se sintetizan en el GCS, tienen la capacidad de excitar a las células GABAérgicas y/o estimular la liberación de GABA.

En el GCS, el transmisor excitatorio equivalente al glutamato central es la ACh. Sin embargo, excepto por los ya notados efectos de la nicotina y la estimulación eléctrica preganglionar (muy difíciles de reproducir en forma consistente), en esta Tesis no obtuvimos pruebas convincentes de que la ACh promueva la liberación de GABA. Tampoco lo hicieron un gran número de sustancias (ver sección Resultados, Tabla 4 y texto adjunto) que son candidatos a mediar efectos fisiológicamente relevantes en este ganglio simpático, dado que son sintetizadas localmente por las células SIF; tampoco agonistas de receptores de GABA que podrían activar autorreceptores, ni dos hormonas que modulan la transmisión simpática (tiroxina y melatonina).

Una posibilidad que no podemos descartar es que el ^3H -GABA no alcance a incorporarse a un pool cuya liberación sea susceptible a activarse por alguna de los compuestos ensayados. Tradicionalmente, la presencia de liberación independiente del Calcio externo se interpretaba como consecuencia de una falla en el proceso de incorporación del trazador al pool fisiológicamente relevante (el vesicular) de neurotransmisor. En este trabajo sin embargo encontramos ambos tipos de liberación de ^3H -GABA; por otra parte día a día aumenta el consenso acerca de la relevancia fisiológica de la liberación mediada por transportador.

Aún en el caso de que el ^3H -GABA fuera almacenado sólo por la glía, podría esperarse que alguno de los compuestos ensayados promoviese la liberación glial de GABA. En contraste con el pensamiento clásico que suponía a la glía como un mero tejido de sostén, en la actualidad es un hecho que los distintos tipos de células gliales desempeñan funciones importantes, incluyendo mecanismos de señalización recíproca con las neuronas. La glía posee receptores para diversas hormonas y neurotransmisores y además sintetiza y libera distintas sustancias neuroactivas. Por ejemplo, se ha hipotetizado que en el SNC la glía puede liberar GABA (endógeno o captado a partir de una fuente exógena) tras la activación de receptores por el glutamato acumulado durante la actividad sináptica intensa. lo cual constituiría un mecanismo de feedback negativo (Attwell y col., 1993).

Además de la acumulación de transmisor excitatorio, la actividad intensa puede producir aumentos transitorios de la $[\text{K}^+]_e$; la existencia de estos transientes extracelulares ha verificado en el GCS (Sacchi y Belluzi, 1993). En contraste con un reporte previo (Bowery y col., 1979a), en nuestras condiciones pudimos detectar liberación de GABA evocada por $[\text{K}^+]_e$ "bajas", como por ejemplo 10 y 20 mM, lo cual permite suponer que exista un mecanismo de liberación de GABA desde la glía que se despolariza en respuesta al K^+ .

En la segunda parte de este trabajo se examinaron algunos efectos de la aplicación de GABA en esta preparación. La perfusión con GABA interrumpe la transmisión del impulso nervioso entre la pre y la postsinapsis ganglionar. Nuestros resultados sugieren que este efecto está mediado principalmente por la activación de receptores tipo GABA_A (sensibles a muscimol, picrotoxina y bicuculina). Aunque en distintos puntos de este trabajo llamamos a

este efecto inhibición de la transmisión excitatoria, la metodología empleada no nos permite afirmar que en el GCS exista una inhibición mediada por GABA análoga a la que se observa en otras regiones del sistema nervioso.

Durante el registro intracelular en el GCS *in vivo* hasta el momento se han observado potenciales sinápticos despolarizantes pero no hiperpolarizantes (Mirgorodsky y Skok, 1969; Ivanov, 1991). *In vitro*, la estimulación preganglionar produce solo potenciales sinápticos mediados por ACh; en tanto que en ausencia de estimulación preganglionar, en las neuronas del GCS se observa una frecuencia relativamente baja de potenciales excitatorios miniatura (Sacchi y Perri, 1971) y hasta donde sabemos no se ha reportado la presencia de potenciales miniatura inhibitorios. Aparentemente, en condiciones fisiológicas el potencial de equilibrio del Cl^- (E_{Cl}) en las neuronas postganglionares del GCS es positivo respecto del potencial de reposo (Adams y Brown, 1975; Ballanyi, 1985), lo cual podría explicar la ausencia de potenciales hiperpolarizantes.

De hecho, la respuesta mas frecuentemente observada frente a la aplicación de GABA exógeno al GCS es despolarizante (Bowery y Brown, 1974; Adams y Brown, 1975; Smart y Constanti, 1990). Aunque esto llevó a algunos investigadores a proponer que el GABA puede actuar como transmisor excitatorio (Kenny y Ariano, 1986; Happolla y col., 1987) esto no es necesariamente así. En los trabajos mencionados se demostró, mediante metodologías diferentes a la usada aquí, que la despolarización correlaciona con el bloqueo de la transmisión del impulso nervioso (Bowery y Brown, 1974) y que el disparo del potencial de acción por estimulación directa de las neuronas postganglionares se ve inhibido durante la acción despolarizante del GABA (Adams y Brown, 1975); sugiriendo que aunque el E_{Cl} sea positivo respecto del reposo (lo cual explicaría la despolarización) posiblemente sea negativo respecto al umbral de disparo.

La presencia de respuestas despolarizantes inhibitorias y mediadas por un aumento de la conductancia al Cl^- a través de receptores GABA_A ha sido descrita previamente por distintos grupos en distintas regiones del sistema nervioso (Mody y col., 1994; Zhang y Jackson, 1995; Jackson y Zhang, 1995) y podría ser la base de la interrupción de la transmisión ganglionar observada en el presente trabajo.

Como ya mencionamos este efecto del GABA se reproduce con muscimol y se antagoniza por picrotoxina y bicuculina por lo cual parece depender de la activación de receptores GABA_A . Si bien el baclofen produjo un cierto bloqueo de la transmisión, su efecto fue aparente sólo a partir de concentraciones relativamente altas y la CE_{50} fue significativamente mayor que la de GABA. Esto contrasta con el hecho de que ambos (baclofen y GABA) se unen con la misma afinidad y actúan con potencia similar sobre los receptores GABA_B (Bowery, 1993). Además, a diferencia de los antagonistas GABA_A , el antagonista GABA_B 2-hidroxisaclofen no produjo efecto significativo sobre el bloqueo de la transmisión por GABA.

Durante la realización de esta Tesis otros autores reportaron una serie de resultados examinando el efecto del GABA (y su farmacología) en el GCS de rata registrando el PAC en el nervio carotídeo interno (Alkadhi y col., 1993). En el trabajo mencionado el baclofen produce bloqueo parcial de la transmisión en sólo un 50 % de las preparaciones testeadas; además el efecto del baclofen es antagonizado por bicuculina y en dicho trabajo no se reporta el efecto de antagonistas GABA_B (si de bicuculina y picrotoxina) sobre la acción del GABA. Es decir que los resultados obtenidos por Alkadhi y col., son en líneas generales coincidentes con los obtenidos aquí.

En este trabajo se estudió además la acción del GABA exógeno sobre la transmisión ganglionar dirigida al nervio carotídeo externo (NCE). Dado que los axones que proyectan por el NCI y el NCE alcanzan estructuras blanco diferentes, resultó interesante desde un punto de vista fisiológico examinar si la activación de receptores de GABA podía afectar también la transmisión del impulso nervioso hacia el NCE. Pudimos demostrar, hasta donde sabemos por primera vez, que el GABA produce un efecto inhibitorio sobre la transmisión al NCE, aunque el efecto máximo es aparentemente menor que al NCI. también fue menor el efecto máximo del antagonista nicotínico hexametonio, lo cual puede explicarse a partir de la presencia de una mayor proporción de "through fibers" en el NCE. Concluimos que el GABA posiblemente afecte de manera similar la transmisión sináptica hacia las neuronas que proyectan por ambos nervios postganglionares y que tal como se ha sugerido antes (Romeo y col., 1986; Bowers y Zigmond, 1981) una parte de las fibras que proyectan por el NCE conducen potenciales de acción propagados que atraviesan el GCS sin interrumpirse por relevo sináptico.

En este trabajo demostramos por primera vez que la aplicación de GABA a través del medio de perfusión, es capaz de inhibir la inducción de potenciación de largo plazo (LTP) por un tren de estimulación tetánica. De acuerdo con la interpretación más aceptada, esta forma de aumento de la eficacia de la transmisión sináptica ganglionar se induce a través de un mecanismo "no hebbiano", que no requiere la coactivación pre y postsináptica. Por el contrario, para su inducción, sólo se requiere la actividad presináptica como lo demuestra entre otras evidencias la falta de efecto sobre la inducción de potenciación del bloqueo total de la transmisión por hexametonio y atropina (Briggs y col., 1985a; Briggs y McAfee, 1988; Scott y Bennett, 1993). Aparentemente entonces no se requiere el efecto postsináptico de la ACh durante la estimulación tetánica.

Como alternativa a la hipótesis presináptica de la inducción de LTP ganglionar podría ocurrir que la inducción dependiera de la activación de receptores postsinápticos para ACh con farmacología nueva, insensibles a los antagonistas colinérgicos clásicos (curare, hexametonio, atropina). También podría ocurrir que durante el protocolo de inducción se liberase algún mediador diferente de la ACh que activase receptores propios no afectados por los bloqueantes de receptores para ACh. Además de ésta última, en las fibras preganglionares se localizan una variedad de péptidos que son candidatos a jugar este rol.

Debido a estas diferentes posibilidades en cuanto al mecanismo de inducción de LTP, no resulta obvio que una droga que inhiba la transmisión ganglionar (como el GABA) deba también tener un efecto inhibitorio sobre la potenciación. Bajo la hipótesis presináptica, la droga (el GABA) podría inhibir la inducción de potenciación si y solo si actuase sobre la presinapsis y afectando alguna etapa del mecanismo de inducción. Según la hipótesis del mediador no colinérgico (péptido?), la droga debería ser capaz de inhibir la liberación del mismo o inhibir su efecto postsináptico. Ninguno de estos efectos puede ser predicho a partir de la observación del bloqueo de la transmisión por GABA mediante la metodología de registro utilizada en este trabajo.

Bajo la interpretación clásica entonces, la inhibición de la inducción de LTP por GABA indicaría la presencia de receptores para este aminoácido ubicados en la presinapsis. Experimentos neuroquímicos realizados aquí y por otros grupos (Brown y Higgins, 1979;

Farkas y col., 1986) apoyan esta idea. Junto a otras evidencias (Bowery y Brown, 1974; Adams y Brown, 1975; Newland y Cull-Candy, 1991) estos resultados permiten concluir que en el GCS existen receptores pre y postsinápticos para GABA.

Los resultados expuestos aquí indicaron también que la aplicación de GABA en los minutos posteriores a la estimulación repetitiva (exactamente 5 min después) puede inhibir la inducción de potenciación, aunque aparentemente la inhibición es mayor cuando el aminoácido se perfunde en coincidencia con el tren. Estos resultados revelaron que la potenciación ganglionar pasa por un período "crítico" de consolidación durante el cual es sensible al menos al efecto del GABA.

Dado que la aplicación del aminoácido provoca un bloqueo de la transmisión que se extiende (durante su presencia más el tiempo de lavado) durante unos minutos, podría pensarse que el efecto se deba a la interrupción de la transmisión o de la llegada del potencial de acción al sitio de inducción de LTP en la presinapsis. Sin embargo, experimentos realizados en nuestro laboratorio (F. Biali, comunicación personal) muestran que tras la interrupción de la transmisión (por suspensión de la estimulación preganglionar) durante un tiempo equivalente al tiempo de efecto del GABA, la potenciación alcanza valores similares a los de un experimento control, indicando que un período de inactividad o reposo subsiguiente a la estimulación tetánica (similar al bloqueo de la transmisión por GABA aplicado 5 min post-tetania) no tiene incidencia sobre el establecimiento de LTP ganglionar.

Los resultados indican entonces que el desarrollo de LTP en el GCS puede estar determinado por al menos dos factores: la ocurrencia fisiológica de patrones de actividad preganglionar repetitiva capaces de inducir LTP y la activación coincidente (simultánea o hasta 5 min post-tetania según nuestros resultados) de receptores para GABA que previene o inhibe la inducción.

La farmacología indicó que la inhibición de la inducción de LTP está mediada por receptores tipo GABA_A, activables por muscimol, insensibles a baclofen y bloqueables por picrotoxina. Recientemente se ha descrito la existencia de un nuevo tipo de receptores de GABA (GABA_C), asociados a un canal de cloruro bloqueable por picrotoxina y activable por muscimol y que se distinguen de los otros por ser insensibles a baclofen y bicuculina-resistentes (Matthews y col., 1994; Mody y col., 1994). Por ello, la clasificación farmacológica de los receptores que median la inhibición de la inducción de LTP en el GCS, requeriría al menos el ensayo del efecto de la bicuculina.

Independientemente de que desde un punto de vista estructural está ampliamente corroborada la presencia de sinapsis GABAérgicas en el GCS, los resultados obtenidos en esta tesis por aplicación de GABA exógeno no nos permiten extraer demasiadas conclusiones sobre un posible efecto sináptico del GABA en este ganglio simpático.

Usualmente se acepta que los aminoácidos actúan a través de mecanismos físicos, de cinética rápida tanto en cuanto a la liberación como a la interacción con los receptores postsinápticos. La dinámica de las perfusiones utilizadas en este trabajo es marcadamente diferente al curso temporal de la acción sináptica del GABA, que aparentemente sigue una cinética exponencial con constantes de tiempo en el orden de los mseg (Machonochie y col., 1994; Mody y col., 1994). Por otra parte, la aplicación de agonistas a través del medio de

perusión puede producir un patrón de activación generalizada y simultánea de los receptores (sinápticos y extrasinápticos) seguramente diferente al que ocurre en condiciones fisiológicas.

Las concentraciones utilizadas (la concentración máxima en el medio de perfusión fue 500 μM) pueden parecer en principio altas pero no lo son tanto si se las compara con las estimaciones con que se cuenta en la actualidad sobre la concentración que en forma efectiva "ven" los receptores durante la transmisión GABAérgica. Distintas evidencias sugieren que la misma alcanza el orden mM (Machonochie y col., 1994; Mody y col., 1994) en forma similar a lo que ocurre con el glutamato (Clements y col., 1992). Estas estimaciones implicarían que durante la transmisión sináptica los receptores de aminoácidos se saturan, hecho aceptado por muchos investigadores de la transmisión GABAérgica (Mody y col., 1994).

La aplicación de neurotransmisores a través del medio de perfusión es "pese a todo" un paradigma que sigue siendo utilizado para el estudio de la transmisión sináptica, incluyendo a la modulación heteróloga de la potenciación de largo plazo (Williams y Johnston, 1984; Brown y col., 1994), y que en muchos casos ha permitido predecir o reproducir el efecto del transmisor cuando es liberado fisiológicamente, como en el caso de la activación por GABA de receptores presinápticos GABA_B, que originalmente se describió mediante la aplicación al baño de GABA o baclofen (Bowery, 1993); posteriormente, en múltiples estudios se verificó que la activación sináptica por el transmisor endógeno produce el mismo efecto (Davies y col., 1991; Mott y Lewis 1991; Bowery, 1993; Davis y Collingridge, 1993).

Nuestros resultados son compatibles con una acción tónica del GABA como mediador intercelular ya que, además del curso temporal relativamente lento de las perfusiones utilizadas, pudimos demostrar que el GABA se libera en respuesta a una despolarización lenta y graduada como la producida por elevación de la $[\text{K}^+]_e$. En este sentido es interesante volver a remarcar que algunos de nuestros resultados sugieren la presencia de mecanismos de liberación mediados por transportador, los cuales se suponen involucrados en la liberación dependiente de cambios graduados del V_m como los que se observan, como ejemplo por excelencia, en los circuitos de la retina.

Por otra parte también observamos un componente de liberación Ca^{2+} -dependiente que fue disminuido por verapamil, droga que bloquea a los canales de Ca^{2+} -voltaje-dependientes de tipo L (Bertolino y Llinas, 1992), los cuales a diferencia de los de tipo N y P (Dunlap y col., 1995) han sido asociados a mecanismos de liberación lenta y sostenida (Artalejo y col., 1994; Johnston y Wu, 1995).

Mecanismos de liberación de este tipo han sido descritos en las células cromafines de la médula de la glándula adrenal (Artalejo y col., 1994). Es interesante destacar que en la suprarrenal se han hallado células cromafines con capacidad de captar, sintetizar y liberar GABA y que el GABA aparentemente modula la estimulación de la secreción de catecolaminas por la ACh liberada desde las fibras "preganglionares" que inervan esta glándula (Kataoka y col., 1984; Oset-Gasque y col., 1985; Castro y col., 1989; Oomori y col., 1993).

La presencia de un "sistema GABAérgico" en el GCS y la médula adrenal fue propuesta casi simultáneamente y partir de resultados experimentales similares. El GCS y la médula adrenal tienen un origen embriológico común (derivan de las células de la cresta neural) y se ha propuesto que en el GCS el GABA se sintetiza y almacena en algunas de las células SIF (Elfvin y col., 1993), aparentemente homólogas a las células cromafines adrenales

pero diferenciadas (por lo menos parcialmente) en neuronas. En la médula de la suprarrenal, que carece de glía, el transporte de GABA tiene mayor sensibilidad al 2,4-DABA que a la β -alanina (Oset-Gasque y col., 1985).

En la adrenal la actividad del GABA endógeno ha podido ser demostrada usando antagonistas de los receptores que median la acción (Kataoka y col., 1984). En este trabajo la picrotoxina no produjo efecto sobre la transmisión ganglionar evocada ya sea a baja o alta frecuencia de estimulación. Durante la estimulación a baja frecuencia (0.017 Hz) la presencia de picrotoxina no modificó la amplitud de la señal postsináptica obtenida con estímulos de intensidad submáxima o supramáxima. Durante la estimulación con un tren de alta frecuencia (diez pulsos a 20 Hz) la transmisión mostró una depresión intratren de la amplitud de la señal postsináptica que, hipotetizamos, podía deberse al menos en parte a una inhibición mediada por GABA. Sin embargo, esta disminución de la amplitud no fue modificada por la presencia de picrotoxina. Una posibilidad es que el decaimiento de la transmisión durante el tren se deba a algún fenómeno que predomine sobre la supuesta inhibición por GABA, y que la remoción de ésta última por picrotoxina no cause efecto aparente. Otra posibilidad es que la estimulación preganglionar no produzca liberación de GABA endógeno.

En contraste con esta última afirmación, la inducción de LTP por un protocolo "débil" de estimulación a alta frecuencia se facilitó en presencia de picrotoxina, independientemente de que en los mismos experimentos la droga no afectó la depresión durante el tren. Estos resultados sugieren que de alguna manera el tren de estimulación repetitiva induce liberación de GABA endógeno, el cual limita la inducción de potenciación a través de receptores sensibles a picrotoxina.

La estimulación eléctrica del tronco preganglionar debería evocar liberación de GABA por activación directa desde las fibras GABAérgicas presentes en él (Dobo y col., 1988); el número total de estas fibras es relativamente bajo, lo cual podría explicar el hecho descrito en este trabajo de que la picrotoxina facilite la inducción de potenciación por un tren débil (20 Hz, 5 seg, intensidad submáxima) pero no por un tren "fuerte" (20 Hz, 20 seg, intensidad supramáxima).

Alternativamente, el tren de estímulos podría evocar liberación de GABA endógeno indirectamente por efecto de la ACh u otro mediador liberado desde las fibras preganglionares. En nuestros experimentos, la facilitación por picrotoxina se observó en ausencia de antagonistas de receptores colinérgicos pero no en su presencia; sin embargo, la estimulación preganglionar o la aplicación de nicotina o muscarina no fueron capaces de inducir liberación de ^3H -GABA. Otro efecto posible de la estimulación a alta frecuencia es el aumento transitorio de la $[\text{K}^+]_e$ por la actividad repetitiva, el cual puede inducir liberación de GABA, tal como se demostró en este trabajo.

En resumen, el efecto facilitatorio de la picrotoxina sugiere que la inducción de LTP (pero no la transmisión a baja frecuencia) está sujeta a una modulación por GABA endógeno similar a la que se observa por aplicación de GABA exógeno. Este hallazgo resalta la trascendencia fisiológica de los resultados obtenidos y sugiere que, dado que esta acción del GABA endógeno solo se evidencia durante la actividad a alta frecuencia, posiblemente exista un efecto de "feedback" negativo disparado en respuesta a la actividad sináptica intensa.

Otros grupos han demostrado que la despolarización del GCS inducida por GABA se potencia en presencia de drogas de la familia de las benzodiazepinas (Little, 1984) y que las benzodiazepinas aplicadas al GCS en ausencia de GABA exógeno producen efectos significativos (Filinger y col., 1989). Se acepta que las benzodiazepinas no producen *per se* activación de los receptores de GABA y que solo potencian el efecto del ligando, por lo cual este último resultado debería implicar la liberación de GABA endógeno ganglionar (Filinger y col., 1989). Una posibilidad interesante es estudiar el efecto de las benzodiazepinas sobre la inducción de LTP ganglionar, estas drogas tienen efectos amnésicos e inhiben la inducción de LTP en el hipocampo (del Cerro y col., 1992), presumiblemente potenciando la inhibición mediada por GABA.

En la última parte de este trabajo se examinó la posibilidad de que el GABA participe en la génesis o la expresión de ritmicidad circadiana a nivel del GCS. Este ganglio simpático (y posiblemente otros también) inerva una serie de órganos blanco cuya actividad presenta una estructura circadiana que se altera por la desnervación (remoción quirúrgica del GCS) (Binkley 1983; Gregory y col., 1985; Cardinali y col., 1986; Siaud y col., 1994).

Ya mencionamos que la actividad GABAérgica de la corteza cerebral en general es aparentemente rítmica (Rosenstein y Cardinali, 1990). Esta ritmicidad, presuntamente generada en el núcleo supraquiasmático (NSQ) del hipotálamo, puede ser conferida a través de una vía neural originada en dicho núcleo, o humoral por medio de la hormona pineal melatonina, que tiene la capacidad de modular la transmisión GABAérgica y se secreta en forma rítmica (Rosenstein y Cardinali, 1990). En teoría, ambos canales de comunicación tienen "libre acceso" al GCS, por lo cual resultó interesante evaluar si algunos parámetros relacionados con la función GABAérgica presentaban ritmicidad diurna en el GCS.

No se encontraron variaciones horarias en la síntesis de GABA (descarboxilación de glutamato mediada por la GAD); en la liberación de ^3H -GABA evocada por K^+ ; ni en la inhibición por GABA de la liberación de ^3H -ACh evocada por K^+ . Es decir que desde el punto de vista de estos parámetros no se pudo demostrar que exista una ritmicidad circadiana en la función GABAérgica ganglionar.

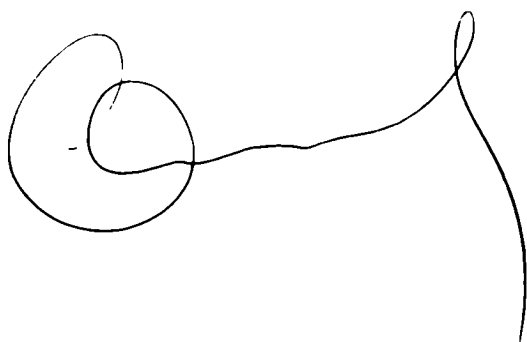
En los mismos experimentos, se observó que la liberación de ^3H -ACh en respuesta al K^+ fue significativamente mayor en GCS de ratas sacrificadas durante la primera mitad de la noche que en otros horarios, independientemente de que el grado de inhibición por GABA no varió con el horario de sacrificio. El aumento de la respuesta al K^+ observado durante la noche no se reprodujo por exposición aguda de los animales a un período de oscuridad previo al sacrificio, lo cual es compatible con un fenómeno verdaderamente rítmico, aunque no se verificó si esta variación horaria persiste en condiciones de "free-running".

El aumento de la liberación de ^3H -ACh en respuesta al K^+ sí fue reproducido por un período previo de actividad preganglionar repetitiva *in vitro* (5 Hz, 20 min), lo que sugeriría que el aumento de la liberación relacionado con la noche podría ser debido a un aumento en la actividad presináptica en los instantes previos al sacrificio nocturno.

En conjunto, estos resultados apoyan la idea de que las neuronas ganglionares sean parte de un canal neural de comunicación entre el sistema circadiano y la periferia. En el caso

concreto de la glándula pineal, se ha demostrado que las neuronas del GCS son la vía final común a través de la cual llega a la glándula la información rítmica generada en el reloj biológico, el núcleo supraquiasmático del hipotálamo. Nuestros resultados muestran que la actividad colinérgica de los terminales preganglionares refleja el arribo de estas señales circadianas a la vía neural originada en el GCS. Dado que este ganglio dedica sólo un pequeño porcentaje de sus neuronas (y del conjunto de terminales preganglionares acompañantes) a inervar esta glándula y debido a que los procedimientos neuroquímicos utilizados difícilmente sean selectivos de la vía "pineal-específica", concluimos que efectivamente una gran parte (y no solo la que es pineal-específica) de la vía eferente simpática originada en el GCS presenta una ritmicidad diurna, por lo menos a nivel preganglionar.

Dado que la modulación de la transmisión ganglionar implica una instancia de integración a nivel periférico (esperamos haber aportado información acerca de la función del GABA en este sentido) debe tenerse en cuenta que el patrón de actividad preganglionar (circadiano o no) puede no trasladarse linealmente a la postsinapsis a consecuencia de modificaciones de la comunicación entre neuronas pre y postganglionares que pueden ocurrir en estos "pequeños cerebros" periféricos.



A smaller, more legible handwritten signature, possibly reading "García", written in a cursive style.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- Adams, P. R. and Brown, D. A., (1975) Actions of γ -aminobutyric acid on sympathetic ganglion cells, *J. Physiol.*, 250: 85-120.
- Adam-Vizi, V., (1992) External Ca^{2+} -independent release of neurotransmitters, *J. Neurochem.*, 58: 395-405.
- Aguayo, L. G. and Alarcón, J. M., (1993) Modulation of the developing rat sympathetic GABA_A receptor by Zn^{++} , benzodiazepines, barbiturates and ethanol, *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 267: 1414-1422.
- Alkadhi, K. A., Salgado, D., Apparsundaram, S., Akpaudo, S., and Hogan, Y. H., (1994) Induction of LTP in a sympathetic ganglion needs 5-HT₃ receptors activation, *Soc. Neurosci. Abst.*, 20: 1515.
- Alkadhi, K. A., Salgado, D., Davis, C. A., and Udofia, E. I., (1993) Effects of γ -aminobutyric acid on the compound action potential of the rat superior cervical ganglion, *Arch. int. Pharmacodyn.*, 322: 66-79.
- Alonso-deFlorida, F., Morales, M. A., and Minzoni, A. A., (1991) Modulated long-term potentiation in the rat superior cervical ganglion in vivo, *Brain Res.*, 544: 203-210.
- Amara, S. G. and Arriza, J. L., (1993) Neurotransmitter transporters: three distinct gene families, *Curr. Op. Neurobiol.*, 3: 337-344.
- Amara, S. G. and Kuhar, M. J., (1993) Neurotransmitter transporters: recent progress, *Annu. Rev. Neurosci.*, 16: 73-93.
- Amenta, F., Bronzetti, E., Cavallotti, C., Felici, L., Ferrante, F., and Collier, W. L., (1992) Autoradiographic localization of the gamma-aminobutyric acid type A receptor agonist ³H-muscimol in the rat superior cervical ganglion, *Pharmacology*, 44: 107-112.
- Anden, N. E. and Grabowska-Anden, M., (1985) Synthesis and utilization of catecholamines in the rat superior cervical ganglion following changes in the nerve impulse flow, *J. Neural Transm.*, 64: 81-92.
- Arai, A., Larson, J., and Lynch, G., (1990) Anoxia reveals a vulnerable period in the development of long-term potentiation, *Brain Res.*, 511: 353-357.
- Araujo, D. M. and Collier, B., (1990) Evidence that endogenous catecholamines can regulate acetylcholine release in a sympathetic ganglion, *Eur. J. Pharmacol.*, 125: 93-101.
- Ariano, M. A., Kenny, S. L., (1985) Peptide coincidence in rat superior cervical ganglion *Brain Res.*, 340: 181-185.
- Arias, C. and Tapia, R., (1986) Differential calcium dependence of γ -aminobutyric acid and acetylcholine release in mouse brain synaptosomes, *J. Neurochem.*, 47: 396-404.
- Artalejo, C. R., Adams, M. E., and Fox, A. P., (1994) Three types of Ca^{2+} channel trigger secretion with different efficacies in chromaffin cells, *Nature*, 367: 72-76.
- Ashe, J. H. and Libet, B., (1981) Orthodromic production of non-cholinergic slow depolarizing response in the superior cervical ganglion of the rabbit, *J. Physiol.*, 320: 333-346.
- Attwell, D., Barbour, B., and Szatkowski, M., (1993) Nonvesicular release of neurotransmitter, *Neuron*, 11: 401-407.
- Axelsson, J. and Thesleff, S., (1959) A study of supersensitivity in denervated mammalian skeletal muscle fibers, *J. Physiol.*, 147: 178-193.

- Bachoo, M. and Polosa, C., (1991) Long-term potentiation of nicotinic transmission by a heterosynaptic mechanism in the stellate ganglion of the cat, *J. Neurophysiol.*, 65: 639-647.
- Bachoo, M. and Polosa, C., (1992) An AF-DX116 sensitive inhibitory mechanism modulates nicotinic and muscarinic transmission in cat superior cervical ganglion in the presence of anticholinesterase, *Can. J. Physiol. Pharmacol.*, 70: 1535-1541.
- Bachoo, M. and Polosa, C., (1992) Preganglionic axons from the third thoracic spinal segment fail to induce long-term potentiation in the superior cervical ganglion of the cat, *Can. J. Physiol. Pharmacol.*, 70: S27-S31.
- Bachoo, M., Heppner, T., Fiekers, J., and Polosa, C., (1992) A role for protein kinase C in long term potentiation of nicotinic transmission in the superior cervical ganglion of the rat, *Brain Res.*, 585: 299-302.
- Ballanyi, K. and Grafe, P., (1985) An intracellular analysis of γ -aminobutyric-acid-associated ion movements in rat sympathetic neurones, *J. Physiol.*, 365: 41-58.
- Bar-Ilan, A., (1984) Diurnal and seasonal variations in intraocular pressure in the rabbit, *Exp. Eye Res.*, 39: 175-181.
- Barontini, M., Romeo, H. E., Armando, I., and Cardinali, D. P., (1988) 24-hour changes in catecholamine content in rat thyroid and submaxillary glands, *J. Neural Transm.*, 71: 189-194.
- Barres, B. A., (1991) New roles of glia, *J. Neurosci.*, 11: 3685-3694.
- Barron, K. D. and Chokroverty, S., (1993) Anatomy of the autonomic nervous system: brain and brainstem En Little Brown & Co (Ed.) Clinical autonomic disorders. The scientific basis., Boston, pp. 3-15.
- Beech, D. J., Bernheim, L., Mathie, A., and Hille, B., (1991) Intracellular Ca^{2+} buffers disrupt muscarinic suppression of Ca^{2+} current and M current in rat sympathetic neurons, *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)*, 88: 652-656.
- Belhage, B., Hansen, G. H., and Schousboe, A., (1993) Depolarization by K^+ and glutamate activates different neurotransmitter release mechanisms in GABAergic neurons - vesicular versus non-vesicular release of GABA, *Neuroscience*, 54: 1019-1034.
- Berg, D. K., Boyd, T., Halvorsen, S. W., Higgins, L. S., Jacob, M. H., Margiotta, J. F., (1989) Regulating the number and function of neuronal acetylcholine receptors *Trends Neurosci.*, 12: 16-21
- Bernath, S., (1992) Calcium-independent release of aminoacid transmitters: fact or artifact?, *Prog. Neurobiol.*, 38: 57-91.
- Bernath, S., Zigmond, M. J., (1990) Calcium-independent GABA release from striatal slices: the role of calcium channels. *Neuroscience*, 36: 677-682.
- Bernath, S., Zigmond, M. J., Nisenbaum, E. S., Vizi, E. S., and Berger, T. W., (1993) Na^+ influx through Ca^{2+} channels can promote striatal GABA efflux in Ca^{2+} -deficient conditions in response to electrical field depolarization, *Brain Res.*, 632: 232-238.
- Bertilsson, L., Suria, A., and Costa, E., (1976) γ -aminobutyric acid in rat superior cervical ganglion, *Nature*, 260: 540-541.
- Bertolino, M. and Llinas, R. R., (1992) The central role of voltage-activated and receptor-operated calcium channels in neuronal cells, *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, 32: 399-421.
- Binkley, S. A., (1983) Circadian rhythms of pineal function in rats, *Endocr. Rev.*, 4: 255-270.

- Birks, R. I. and Isacoff, E. Y., (1988) Burst-patterned stimulation promotes nicotinic transmission in isolated perfused rat sympathetic ganglia, *J. Physiol.*, 402: 515-532.
- Blaustein, M. P., (1971) Preganglionic stimulation increases calcium uptake by sympathetic ganglia, *Science*, 172: 391-393.
- Boczek-Funcke, A., Dembowski, K., Habler, H. -, Jänig, W., Macron, R. M., and Michaelis, M., (1992) Classification of preganglionic neurones projecting into the cat cervical sympathetic trunk, *J. Physiol.*, 453: 319-339.
- Boczek-Funcke, A., Dembowski, K., Habler, H. -, Janig, W., and Michaelis, M., (1992) Respiratory-related activity patterns in preganglionic neurones projecting into the cat cervical sympathetic trunk, *J. Physiol.*, 457: 277-296.
- Boczek-Funcke, A., Dembowski, K., Habler, H. -, Janig, W., and Michaelis, M., (1993) Spontaneous activity, conduction velocity and segmental origin of different classes of thoracic preganglionic neurons projecting into the cat cervical sympathetic trunk, *J. Auton. Nerv. Syst.*, 43: 189-200.
- Borden, L. A., Smith, K. E., Hartig, P. R., Branchek, T. A., and Weinshank, R. L., (1992) Molecular heterogeneity of the γ -aminobutyric acid (GABA) transport system, *J. Biol. Chem.*, 267: 21098-21104.
- Bormann, J., (1988) Electrophysiology of GABA_A and GABA_B receptor subtypes, *Trend Neurosci.*, 11: 112-116.
- Bouskila, Y. and Dudek, F. E., (1993) Neuronal synchronization without active calcium dependent synaptic transmission in the hypothalamus, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90: 3207-3210.
- Bowers, C. W. and Zigmond, R. E., (1979) Localization of neurons in the rat superior cervical ganglion that project into different postganglionic trunks, *J. Comp. Neurol.*, 185: 381-392.
- Bowers, C. W. and Zigmond, R. E., (1981) Sympathetic neurons in lower cervical ganglia send axons through the superior cervical ganglion, *Neuroscience*, 6: 1783-1791.
- Bowers, C. W., Dahm, L. M., and Zigmond, R. E., (1984) The number and distribution of sympathetic neurons that innervate the rat pineal gland, *Neuroscience*, 13: 87-96.
- Bowery, N. G., (1990) GABA transporter protein cloned from rat brain, *Trends Pharm. Sci.*, 11: 435-436.
- Bowery, N. G., (1993) GABA_B receptor pharmacology, *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, 33: 107-147.
- Bowery, N. G. and Brown, D. A., (1972) γ -aminobutyric acid uptake by sympathetic ganglia, *Nature New Biology*, 238: 89-91.
- Bowery, N. G. and Brown, D. A., (1974) Depolarizing actions of γ -aminobutyric acid and related compounds on rat superior cervical ganglion, *Br. J. Pharmacol.*, 50: 205-218.
- Bowery, N. G. and Dray, A., (1978) Reversal of the action of amino acid antagonists by barbiturates and other hypnotic drugs, *Br. J. Pharmacol.*, 63: 197-215.
- Bowery, N. G. and Hill, D. R., (1986) GABA mechanisms in autonomic ganglia En Erdo, S. L. and Bowery, N. G.(Eds.) GABAergic mechanisms in the mammalian periphery, Raven Press, New York, pp. 135-152.
- Bowery, N. G. and Neal, M. J., (1975) Failure of denervation to influence the high affinity uptake of choline by sympathetic ganglia *Br. J. Pharmacol.*, 55: 278P.
- Bowery, N. G., Brown, D. A., and Marsh, S., (1979) γ -aminobutyric acid efflux from sympathetic glial cells: effect of 'depolarizing' agents, *J. Physiol.*, 293: 75-101.

- Bowery, N. G., Brown, D. A., White, R. D., and Yamini, G., (1979) [³H]γ-aminobutyric acid uptake into neuroglial cells of rat superior cervical sympathetic ganglia, *J. Physiol.*, 293: 51-74.
- Bowery, N. G., Hill, D. R., and Möhler, H., (1979) Sodium independent GABA receptor binding in peripheral nervous tissue, *Br. J. Pharmacol.*, 67: 445P-446P.
- Bowery, N. G., Jones, G. P., and Neal, M. J., (1976) Selective inhibition of neuronal GABA uptake by cis-1,3-aminocyclohexane carboxylic acid, *Nature*, 264: 281-284.
- Bowery, N., Doble, A., Hill, D. R., Hudson, A. L., and Shaw, J. S., (1981) Bicuculline-insensitive GABA receptors on peripheral nerve terminals, *Eur. J. Pharmacol.*, 71: 53-70.
- Briggs, C. A., (1992) Potentiation of nicotinic transmission in the rat superior cervical sympathetic ganglion: effects of cyclic GMP and nitric oxide, *Brain Res.*, 573: 139-146.
- Briggs, C. A. and McAfee, D. A., (1988) Long-term potentiation at nicotinic synapses in the rat superior cervical ganglion, *J. Physiol.*, 404: 129-144.
- Briggs, C. A., Brown, T. H., and McAfee, D. A., (1985a) Neurophysiology and pharmacology of long-term potentiation in the rat sympathetic ganglion, *J. Physiol.*, 359: 503-521.
- Briggs, C. A., Horwitz, J., McAfee, D., Tsymbalor, S., and Pearlman, R., (1985b) The effects of neuronal activity on inositol-phospholipid metabolism in the rat autonomic nervous system, *J. Neurochem.*, 44: 731-739.
- Briggs, C. A., McAfee, D. A., and McCaman, R. E., (1985c) Long-term potentiation of synaptic acetylcholine release in the superior cervical ganglion of the rat, *J. Physiol.*, 363 181-190.
- Briggs, C. A., McAfee, D. A., and McCaman, R. E., (1988) Long-term regulation of synaptic acetylcholine release and nicotinic transmission: the role of cyclic AMP, *Br. J. Pharmacol.*, 93: 399-411.
- Briggs, C. A., Whiting, G. J., Ariano, M. A., and McAfee, D. A., (1982) Cyclic nucleotide metabolism in the sympathetic ganglion, *Cell. Mol. Neurobiol.*, 2: 129-141.
- Brown, D. A. and Constanti, A., (1978) Interaction of pentobarbitone and γ-aminobutyric acid on mammalian sympathetic ganglion cells. *Br. J. Pharmacol.*, 63: 217-224.
- Brown, D. A. and Constanti, A., (1980) Intracellular observations on the effects of muscarinic agonists on rat sympathetic neurones, *Br. J. Pharmacol.*, 70: 593-608.
- Brown, D. A. and Higgins, A. J., (1979) Presynaptic effects of γ-aminobutyric acid in isolated rat superior cervical ganglia, *Br. J. Pharmacol.*, 66: 108P-109P.
- Brown, D. A. and Marsh, S. J., (1978) Axonal GABA receptors in mammalian peripheral nerve trunks. *Brain Res.*, 156: 187-191.
- Brown, D. A. and Selyanko, A. A., (1985) Membrane currents underlying the cholinergic slow excitatory post-synaptic potential in the rat sympathetic ganglion. *J. Physiol.*, 365: 365-387.
- Brown, D. A., Fatherazi, S., Garthwaite, J., and White, R. D., (1980) Muscarinic receptors in rat sympathetic ganglia, *Br. J. Pharmacol.*, 70: 577-592.
- Brown, R. E., Haas, H. J., Reymann, K. G., (1994) Histamine and long-term potentiation, *Soc. Neurosci. Abstracts*, 20: 1515.
- Brown, T. H. and McAfee, D. A., (1982). Long-term synaptic potentiation in the superior cervical ganglion. *Science* 215: 1411-1413

- Buhl, E. H., Halasy, K., Somogyi, P., (1994) Diverse source of hippocampal unitary inhibitory postsynaptic potentials and the number of synaptic release sites, *Nature*, 369: 823-828.
- Bulygin, I. A., (1983) A consideration of the general principles of organization of sympathetic ganglia, *J. Auton. Nerv. Syst.*, 8: 303-330.
- Cabeza, R. and Collier, B., (1988) Acetylcholine mobilization in a sympathetic ganglion in the presence and absence of 2-(4-phenylpiperidino)cyclohexanol (AH5 183), *J. Neurochem.*, 50: 112-121.
- Cammack, J. N. and Schwartz, E. A., (1993) Ions required for the electrogenic transport of GABA by horizontal cells of the catfish retina, *J. Physiol.*, 472: 81-102.
- Cammack, J. N., Rakhilin, S. V., and Schwartz, E. A., (1994) A GABA transporter operates asymmetrically and with variable stoichiometry, *Neuron*, 13: 949-960.
- Cardinali, D. P., (1988) Los relojes biológicos, *Ciencia Hoy*, 1: 10-19.
- Cardinali, D. P., (1995) Sistema nervioso autónomo En *Manual de Neurofisiología*, pp. 265-292.
- Cardinali, D. P. and Romeo, H. E., (1991) The autonomic nervous system of the cervical region as a channel of neuroendocrine communication, *Front. Neuroendocrinol.*, 12: 278-297.
- Cardinali, D. P., Golombek, D. A., and Bonnani-Rey, R., (1992) Relojes y calendarios biológicos. La sincronía del hombre con su medio ambiente, Buenos Aires.
- Cardinali, D. P., Romeo, H. E., Boado, R. J., and Deza, S., (1986) Early inhibition and changes in diurnal rhythmicity of the pituitary-thyroid axis after superior cervical ganglionectomy, *J. Auton. Nerv. Syst.*, 16: 13-21.
- Cardinali, D. P., Vacas, M. I., and Gejman, P. V., (1981) The sympathetic superior cervical ganglia as peripheral neuroendocrine centers, *J. Neural Transm.*, 52: 1-21.
- Carneiro, R. C. G., Cipolla-Neto, J., and Markus, R. P., (1991) Diurnal variations of the rat vas deferens contraction induced by stimulation of presynaptic nicotinic receptors and pineal function, *J. Pharm. Exp. Ther.*, 259: 614-619.
- Carneiro, R. C. G., Toffoleto, O., Cipolla Neto, J., and Markus, R. P., (1994) Modulation of sympathetic neurotransmission by melatonin. *Eur. J. Pharmacol.*, 257: 73-77.
- Carter, D. A., (1990) Temporally defined induction of c-fos in the rat pineal, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 166: 589-594.
- Castro, E., Oset-Gasque, M. J., and Gonzalez, M. P., (1989) GABA_A and GABA_B receptors are functionally active in the regulation of catecholamine secretion by bovine chromaffin cells, *J. Neurosci. Res.*, 23: 290-296.
- Cheng, Y.-C. and Prusoff, W. H., (1973) Relationship between the inhibition constant (K_i) and the concentration of inhibitor which causes 50 percent inhibition (IC₅₀) of an enzymatic reaction, *Biochem. Pharmacol.*, 22: 3099-3108.
- Christian, E. P., Udem, B. J. and Weinreich, D., (1989) Endogenous histamine excites neurones in the guinea-pig superior cervical ganglion *in vitro*, *J. Physiol.*, 409: 297-312
- Christian, E. P. and Weinreich, D., (1992) Presynaptic histamine H1 and H3 receptors modulate sympathetic ganglionic synaptic transmission in the guinea-pig, *J. Physiol.*, 457: 407-430.
- Chuluyan, H. E., Rosenstein, R. E., Kanterewicz, B. I., Chang, S. M., and Cardinali, D. P., (1992) GABA activity in dispersed bovine pineal cells: effect on serotonin release and calcium and chloride uptake, *Biol. Signals*, 1: 3-11.

- Chunhabundit, P., Thongpila, S., and Somana, R., (1992) Microvascularization of the rat superior cervical ganglion, *Act Anat.*, 143: 54-58.
- Clark, J. A., Deutch, A. Y., Gallipoli, P. Z., and Amara, S. G., (1992) Functional expression and CNS distribution of a β -alanine-sensitive neuronal GABA transporter, *Neuron*, 9: 337-348.
- Clements, J. D., Lester, R. A., Tong, G., Jahr, C., and Westbrook, G. L., (1992) The time course of glutamate in the synaptic cleft, *Science*, 258: 1498-1501.
- Cole, A. E. and Shinnick-Gallager, P., (1984) Muscarinic inhibitory transmission in mammalian sympathetic ganglia mediated by increased potassium conductance, *Nature*, 307: 270-271.
- Collier, B. and Katz, H. S., (1974) Acetylcholine synthesis from recaptured choline by a sympathetic ganglion, *J. Physiol.*, 238: 639-655.
- Collier, B., Welner, S. A., Ricny, J., and Araujo, D. M., (1974) Acetylcholine synthesis and release by a sympathetic ganglion in the presence of 2-(4-phenylpiperidino)cyclohexanol (AH5183), *J. Neurochem.*, 46: 822-830.
- Corey, J. L., Guastella, J., Davidson, N., and Lester, H. A., (1994) GABA uptake and release by a mammalian cell line stably expressing a cloned rat brain GABA transporter, *Molec. Memb. Biol.*, 11: 23-30.
- Craig, D. A., (1993) The Cheng-Prusoff relationship: something lost in the translation, *Trends Pharmacol. Sci.*, 14: 89-91.
- Cull-Candy, S. G., Magnus, C. J., and Mathie, A., (1986) Freshly dissociated rat sympathetic neurones: a preparation suitable for patch clamp recording, *J. Physiol.*, 377: 2P.
- Dagerlind, A., Zhang, X., Brimijoin, S., Lindh, B., and Hokfelt, T., (1994) Effects of preganglionic sympathectomy on peptides in the rat superior cervical ganglion, *Neuroreport*, 5: 909-912.
- Davies, C. H. and Collingridge, G. L., (1993) The physiological regulation of synaptic inhibition by GABA_B autoreceptors in rat hippocampus, *J. Physiol.*, 472: 245-265.
- Davies, C. H., Starkey, S. J., Pozza, M. F., and Collingridge, G. L., (1991) GABA_B autoreceptors regulate the induction of LTP, *Nature*, 349: 609-611.
- de Groat, W. C., (1970) The actions of γ -aminobutyric acid and related amino acids on mammalian autonomic ganglia, *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 172: 384-396.
- de Groat, W. C., Lalley, P. M., and Block, M., (1971) The effects of bicuculline and GABA on the superior cervical ganglion of the cat, *Brain Res.*, 25: 665-668.
- del Cerro, S., Jung, M., and Lynch, G., (1992) Benzodiazepines block long-term potentiation in slices of hippocampus and piriform cortex, *Neuroscience*, 49: 1-6.
- Derkach, V. A., North, R. A., Selyanko, A. A., and Skok, V. I., (1987) Single channels activated by acetylcholine in rat superior cervical ganglion, *J. Physiol.*, 388: 141-151.
- Dibner, M. D., Mytilineou, C., and Black, I. B., (1977) Target organ regulation of sympathetic neuron development, *Brain Res.*, 123: 301-310.
- Dobo, E., Kasa, P., Joo, F., Wenthold, R. J., and Wolff, J. R., (1990) Structures with GABA-like and GAD-like immunoreactivity in the cervical sympathetic ganglion complex of adult rats, *Cell Tissue res.*, 262: 351-361.
- Dobo, E., Kasa, P., Wenthold, R. J., Joo, F., and Wolff, J. R., (1989) Evidence for GABAergic fibers entering the superior cervical ganglion of rat from the preganglionic nerve trunk, *Histochemistry*, 92: 133-136.

- Dun, N. J., Ganglionic transmission: electrophysiology and pharmacology, (1980) *Federation Proc.*, 39: 2982-2989.
- Dun, N. J. and Karczmar, A. G., (1978) Involvement of an interneuron in the generation of the slow inhibitory postsynaptic potential in mammalian sympathetic ganglia, *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)*, 75: 4029-4032.
- Dun, N. J., Dun, S. L., Wu, S. Y., and Forstermann, U., (1993) Nitric oxide synthase immunoreactivity in rat superior cervical ganglia and adrenal glands, *Neurosci. Lett.*, 158: 51-54.
- Dun, N. J., Wu, E. S., Miyakazi, T., Dun, S. L., and Ren, C., (1992) Synaptic mechanisms in sympathetic preganglionic neurons, *Can. J. Physiol. Pharmacol.*, 70: S86-S91.
- Dunant, Y., (1967) Organisation topographique et fonctionnelle du ganglion cervical superieur chez le rat, *J. Physiol. (Paris)*, 59: 17-38.
- Dunant, Y. and Dolivo, M., (1967) Relations entre les potentiels synaptiques lents et l'excitabilite du ganglion sympathique chez le rat, *J. Physiol. (Paris)*, 59: 281-294.
- Dunant, Y. and Dolivo, M., (1968) Plasticity of synaptic functions in the excised sympathetic ganglion of the rat, *Brain Res.*, 10: 271-273.
- Dunant, Y. and Dolivo, M., (1968) Presynaptic recording in excised sympathetic ganglion of the rat, *Brain Res.*, 10: 268-270.
- Dunlap, K., Luebke, J. I., and Turner, T. J., (1995) Exocytotic calcium channels in mammalian central neurons, *Trend Neurosci.*, 18: 89-98.
- Ebbesson, S. O. E., (1963) A quantitative study of human superior cervical sympathetic ganglia, *Anat. Rec.*, 4: 353-356.
- Eichenbaum, H. and Otto, T., (1993) LTP and memory: can we enhance the connection?, *Trend Neurosci.*, 16: 163-164.
- Elfvin, L. G., Lindh, B., and Hökfelt, T., (1993) The chemical neuroanatomy of sympathetic ganglia. *Annu. Rev. Neurosci.*, 16 471-507.
- Erdo, S. L., (1985) Peripheral GABAergic mechanisms. *Trends Pharmacol. Sci.*, May: 205-208.
- Erdo, S. L. and Kiss, B., (1986) Presence of GABA, glutamate decarboxylase, and GABA transaminase in peripheral tissues: a collection of quantitative data En Erdo, S. L. and Bowery, N. G.(Eds.) GABAergic mechanisms in the mammalian periphery, Raven Press, New York, pp. 5-17.
- Erdo, S. L. and Wolff, J. R., (1990) γ -Aminobutyric acid outside the mammalian brain, *J. Neurochem.*, 54: 363-372.
- Erdo S, L. and Bowery, N. G., (1986) GABAergic mechanisms in the mammalian periphery, Raven Press, New York.
- Erecinska, M., (1987) The neurotransmitter aminoacid transport systems. A fresh outlook to an old problem, *Biochem. Pharmacol.*, 36: 3547-3555.
- Farkas, Z., Kasa, P., Balcar, V. J., Joo, F., and Wolff, J. R., (1986) Type A and B GABA receptors mediate inhibition of acetylcholine release from cholinergic nerve terminals in the superior cervical ganglion of rat, *Neurochem. Int.*, 8: 565-572.
- Feldberg, G. and Gaddum, J. H., (1934) The chemical transmitter at synapses in sympathetic ganglion, *J. Physiol.*, 81: 305-319.

- Field, J. L., Newberry, N. R., (1991) On the histamine-induced depolarization of the isolated superior cervical ganglion of the rat, *Br. J. Pharmacol.*, 103: 1752-1756.
- Filinger, E. J., Elgoyen, A. B., and Adler-Graschinsky, E., (1989) Benzodiazepines decrease the release of [3H]noradrenaline and acetylcholine in the cat superior cervical ganglion, *Neurosci. Lett.*, 105: 195-199.
- Flett, D. A. and Bell, C., (1991) Topography of functional subpopulations of neurons in the superior cervical ganglion of the rat, *J. Anat.*, 177: 55-66.
- Flett, D. L. and Bell, C., (1990) The impact of sexual dimorphism on neuron numbers in the superior cervical ganglion of the rat, *J. Auton. Nerv. Syst.*, 30: 23-28.
- Fonnum, F., (1985) Determination of amino acid transmitter turnover. In Boulton, A. A., Baker, G. B., and Wood, J. D. (Eds.) *Neuromethods. Amino Acids*, Humana Press, Clifton, New Jersey, pp. 239-272.
- Fregnac, Y. and Schulz, D., (1992) Models of synaptic plasticity and cellular analogs of learning in the developing and adult vertebrate visual cortex *Advances in Neural and Behavioral Development*, pp. 1-66.
- Friesen, A. J. D. and Khatter, J. C., (1971) Effect of stimulation on synaptic vesicles in the superior cervical ganglion of the cat, *Experientia*, 27: 285-287.
- Gibbins, I. L., (1991) Vasomotor, pilomotor and secretomotor neurons distinguished by size and neuropeptide content in superior cervical ganglia of mice, *J. Auton. Nerv. Syst.*, 34: 171-184.
- Gilbey, M. P., Numao, Y., and Spyer, K. M., (1986) Discharge patterns of cervical sympathetic preganglionic neurones related to central respiratory drive in the rat, *J. Physiol.*, 378: 253-265.
- Gisiger, V., Vigny, M., Gautron, J., and Rieger, F., (1978) Acetylcholinesterase of rat sympathetic ganglion: molecular forms, localization and effects of denervation, *J. Neurochem.*, 30: 501-516.
- Golombek, D. A., Escolar, E., Burin, L., de Brito Sanchez, M. G., Fernandez Duque, D., and Cardinali, D. P., (1992) Chronopharmacology of melatonin: inhibition by benzodiazepine antagonism, *Chronobiol. Int.*, 9: 124-131.
- Gonzalez Burgos, G. R., Biali, F. I., Cherksey, B. D., Sugimori, M., Llinas, R. R., and Uchitel, O. D., (1995) Different calcium channels mediate transmitter release evoked by transient or sustained depolarization at mammalian sympathetic ganglia, *Neuroscience*, 64: 117-123.
- Gregory, D. S., Aviado, D. G., and Sears, M. L., (1985) Cervical ganglionectomy alters the circadian rhythm of intraocular pressure in new zealand white rabbits, *Curr Eye Res.*, 4: 1273-1279.
- Guastella, J. G., Nelson, N., Nelson, H., Czyzyk, L., Keynan, S., Miedel, M. C., Davidson, L. H. A., Kanner, B. I., (1990) Cloning and expression of a rat brain GABA transporter, *Science*, 249: 1303-1306.
- Gustafsson, B. and Wigström, (1988) Physiological mechanisms underlying long-term potentiation, *Trend Neurosci.*, 11: 156-162.
- Häppölä, O., Päiväranta, H., Soinila, S., Wu, J. Y., and Panula, P., (1987) Localization of L-glutamate decarboxylase and GABA transaminase immunoreactivity in the sympathetic ganglia of the rat, *Neuroscience*, 21: 271-281.
- Häppölä, O., Soinila, S., Päiväranta, H., Panula, P., and Eränkö, O., (1985) Histamine immunoreactive cells in the superior cervical ganglion and in the coeliac-superior complex of the rat, *Histochemistry*, 82: 1-3.
- Häppölä, O., (1988) 5-Hydroxytryptamine-immunoreactive neurons and nerve fibers in the superior cervical ganglion of the rat, *Neuroscience*, 27: 301-307.

- Harati, Y., (1993) Anatomy of the spinal and peripheral autonomic nervous system En Clinical autonomic disorders. The scientific basis., Little, Brown & Co., Boston, pp. 17-37.
- Harris, R. A. and Allan, A. M., (1985) Functional coupling of γ -aminobutyric acid receptors to chloride channels in brain membranes, *Science*, 228: 1108-1110.
- Hille, B., (1992) Modifiers of gating En Ionic channels of excitable membranes, Sinauer Associates, Massachusetts, pp. 445-471.
- Isaacson, J. S., Solis, J. M., and Nicoll, R. A., (1993) Local and diffuse synaptic actions of GABA in the hippocampus, *Neuron*, 10: 165-175.
- Ivanov, A. Y., (1991) Pattern of ongoing activity in rat superior cervical ganglion neurons projecting to a specific target, *J. Auton. Nerv. Syst.*, 32: 77-80.
- Ivanov, A. Y. and Skok, V. I., (1992) Neuronal mechanisms responsible for ongoing activity of rabbit superior cervical ganglion neurons, *J. Auton. Nerv. Syst.*, 41: 61-66.
- Iversen, L. L. and Kelly, J. S., (1992) Uptake and metabolism of γ -aminobutyric acid by neurones and glial cells, *Biochem. Pharmacol.*, 24: 933-938.
- Izquierdo, I., (1994) Pharmacological evidence for a role of long-term potentiation in memory, *FASEB J*, 8: 1139-1145.
- Jänig, W. and McLachlan, E. M., (1992a) Characteristics of function-specific pathways in the sympathetic nervous system, *Trend Neurosci.*, 15: 475-481.
- Jänig, W. and McLachlan, E. M., (1992b) Specialized functional pathways are the building blocks of the autonomic nervous system, *J. Auton. Nerv. Syst.*, 41: 3-14.
- Jänig, W. and Schmidt, R. F., (1970) Single unit responses in the cervical sympathetic trunk upon somatic nerve stimulation, *Pflügers Arch.*, 314: 199-216.
- Jackson, M. B. and Zhang, S. J., (1995) Action potential propagation and propagation block by GABA in rat posterior pituitary nerve terminals, *J. Physiol.*, 483: 597-611.
- Jessell, T. M., (1991) Reactions of neurons to injury. En Kandel, E. R., Schwartz, J. H., and Jessell, T. M. (Eds.) Principles of Neural Science, Appleton & Lange, Connecticut, pp. 258-269.
- Johnston, D. and Wu, S. M., (1995a) Functional diversity of voltage-gated ionic conductances. En *Foundations of cellular neurophysiology*, The MIT Press, Cambridge, Massachusetts, 183-214.
- Johnston, D. and Wu, S. M., (1995b) Synaptic transmission I: Presynaptic mechanisms. Use-dependent synaptic plasticities En *Foundations of cellular neurophysiology*, The MIT Press, Massachusetts, 309.
- Johnston, G. A. R., Stephanson, A. L., and Twitchin, B., (1976) Uptake and release of nipectic acid by brain slices, *J. Neurochem.*, 26: 83-87.
- Joo, F., Lever, J. D., Ivens, C., Mottram, D. R., and Presley, R., (1971) A fine structural and electron histochemical study of axon terminals in the rat superior cervical ganglion after acute and chronic preganglionic denervation, *J. Anat.*, 110: 181-189.
- Jordan, D., Rosset, B., Perrin, F., Fournier, M., and Orgiazzi, J., (1980) Evidence for circadian variations in serum thyrotropin, 3,5,3'-triiodothyronine and thyroxine in the rat, *Endocrinology*, 107: 1245-1248.
- Junge, D., (1992a) Electrical recordings from neurons and single muscle fibers. The compound action potential En *Nerve and Muscle Excitation*, Sinauer Associates, Massachusetts, pp. 2-7.

- Junge, D., (1992b) Ionic properties of resting and active membranes. Calcium effects En Nerve and Muscle Excitation, Sinauer Associates, Sunderland, Massachusetts, pp. 54.
- Kadota, T., Mizote, M., Moroi, K., Ozaki, N., and Kadota, K., (1993) Rapid recovery of structure and function of the cholinergic synapses in the cat superior cervical ganglion in vivo following stimulation-induced exhaustion, *J. Neurocytol.*, 22: 743-752.
- Kafka, M. S., Thoa, N. B., (1979) α -adrenergic receptors in the rat superior cervical ganglion, *Biochem. Pharmacol.*, 28: 2485-2489.
- Kanagawa, Y., Matsuyama, T., Wanaka, A., Yoneda, S., Kimura, K., Kamada, T., Steinbush, W. M., Tohyama, M., (1986) Coexistence of enkephalin- and serotonin-like substances in single small intensely fluorescent cells of the guinea pig superior cervical ganglion, *Brain Res.*, 379: 377-379.
- Kanazawa, I., Iversen, L. L., and Kelly, J. S., (1976) Glutamate decarboxylase activity in the rat posterior pituitary, pineal gland, dorsal root ganglion and superior cervical ganglion, *J. Neurochem.*, 27: 1267-1269.
- Kanter, E. D. and Haberly, L. B., (1993) Associative long-term potentiation in piriform cortex slices requires GABA_A blockade, *J. Neurosci.*, 13: 2477-2482.
- Kanterewicz, B. I., Golombek, D. A., Rosenstein, R. E., and Cardinali, D. P., (1993) Diurnal changes of GABA turnover rate in brain and pineal gland of syrian hamster, *Brain Res. Bull.*, 31: 661-666.
- Kasa, P., Dobo, E., and Wolff, J. R., (1991) GABAergic action on cholinergic axon terminals in the superior cervical ganglion En Erdo, S. L.(Ed.) GABA Outside the CNS, Springer Verlag, Berlin, pp. 83-93.
- Kasa, p., Dobo, E., Wolff, J. R. (1991) Cholinergic innervation of the mouse superior cervical ganglion: light- and electron-microscopic immunocytochemistry for choline acetyltransferase *Cell Tissue Res.* 265: 151-158.
- Kasa, P., Joo, F., Dobo, E., Wenthold, R. J., Ottersen, O. P., Storm-Mathisen, J., and Wolff, J. R., (1988) Heterogeneous distribution of GABA-immunoreactive nerve fibers and axon terminals in the superior cervical ganglion of the adult rat, *Neuroscience*, 26: 635-644.
- Kataoka, Y., Gutman, Y., Guidotti, A., Panula, P., Wroblewski, J., Cosenza-Murphy, D., Wu, J. Y., and Costa, E., (1984) Intrinsic GABAergic system of adrenal chromaffin cells, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 81: 3218-3222.
- Katz, B., (1969) The release of neurotransmitter substances. Liverpool University Press. Liverpool.
- Katz, H. S., Salehmoghaddam, S., and Collier, B., (1973) The accumulation of radioactive acetylcholine by a sympathetic ganglion and by brain: failure to label endogenous stores, *J. Neurochem.*, 20: 569-579.
- Kelly, R. B., (1993) Storage and release of neurotransmitters. *Neuron*, 10: 43-53.
- Kenny, S. L. and Ariano, M. A., (1986) The immunofluorescence localization of glutamate decarboxylase in the rat superior cervical ganglion, *J. Auton. Nerv. Syst.*, 17: 211-215.
- Kessler, J. A. and Black, I. B., (1982) Regulation of substance P in adult rat sympathetic ganglia. *Brain Res.* 234: 182-187.
- Klingman, J. D., Organisciak, D. T., and Klingman, G. I., (1980) Ganglionic metabolism En Pharmacology of ganglionic transmission. *Handbook of experimental pharmacology*, pp. 41-62.
- Koyano, K., Kuba, K., and Minota, S., (1985) Long-term potentiation of transmitter release induced by repetitive presynaptic activities in bull-frog sympathetic ganglia, *J. Physiol.*, 359 219-233.
- Krnjevic, K., (1984) Some functional consequences of GABA uptake by brain cells, *Neurosci. Lett.*, 47: 283-287.

- Krogsgaard-Larsen, P. and Johnston, G. A., (1975) Inhibition of GABA uptake in rat brain slices by nipecotic acid, various isoxazoles and related compounds, *J. Neurochem.*, 25: 797-802.
- Kuhar, M. J. and Murrin, L. C., (1978) Sodium-dependent high affinity choline uptake, *J. Neurochem.*, 30: 15-21.
- Kupfermann, I., (1991) Hypothalamus and limbic system: peptidergic neurons, homeostasis and emotional behavior En Kandel, E. R., Jessell, T. H., and Schwartz, J. M.(Eds.) Principles of Neural Science, Elsevier, New York, pp. 735-749.
- Landa, M. E., Gonzalez Burgos, G., and Cardinali, D. P., (1991) In vitro effect of thyroxine on cholinergic neurotransmission in the rat sympathetic superior cervical ganglion, *Neuroendocrinology*, 54: 552-558.
- Lester, H. A., Mager, S., Quick, M. W., and Corey, J. L., (1994) Permeation properties of neurotransmitter transporters, *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, 34: 219-249.
- Levi, G. and Raiteri, M., (1993) Carrier-mediated release of neurotransmitters, *Trend Neurosci.*, 16: 415-419.
- Levi, G., Gallo, V., and Raiteri, M., (1980) A reevaluation of veratridine as a tool for studying the depolarization-induced release of neurotransmitters from nerve endings, *Neurochem. Res.*, 5: 281-295.
- Libet, B., (1986) Nonclassical synaptic functions of transmitters, *Federation Proc.*, 45: 2678-2686.
- Libet, B., (1992) Introduction to slow synaptic potentials and its neuromodulation by dopamine, *Can. J. Physiol. Pharmacol.*, 70: S3-S11.
- Little, H. J., (1984) The effects of benzodiazepine agonists, inverse agonists and Ro 15-1788 on the response of the superior cervical ganglion to GABA in vitro, *Br. J. Pharmacol.*, 83: 57-68.
- 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.
- Luebke, J. I., Weight, F. F., and Aguayo, L. A., (1992) Labelling and recording from dissociated target-specific rat superior cervical ganglion neurons, *Neurosci. Lett.*, 135: 210-214.
- Macdonald, R. L. and Olsen, R. W., (1994) GABA_A receptor channels. *Annu. Rev. Neurosci.*, 17: 569-602.
- Maconochie, D. J., Zempel, J. M., and Steinbach, J. H., (1994) How quickly can GABA(A) receptors open?. *Neuron*, 12: 61-71.
- MacVicar, B. A., Tse, F. W. Y., Crichton, S. A., and Kettenmann, H., (1989) GABA-activated Cl⁻ channels in astrocytes of hippocampal slices, *J. Neurosci.*, 9: 3577-3583.
- Magee, J. C. and Schofield, G. G., (1992) Neurotransmission through sympathetic ganglia of spontaneously hypertensive rats, *Hypertension*, 20: 367-373.
- Mager, S., Naeve, J., Quick, M., Labarca, C., Davidson, N., and Lester, H. A., (1993) Steady states, charge movements and rates for a cloned GABA transporter expressed in *Xenopus* oocytes, *Neuron*, 10: 177-188.
- Mandelzys, A., Pie, B., Deneris, E. S., and Cooper, I., (1994) The developmental increase in ACh current densities on rat sympathetic neurons correlates with changes in nicotinic ACh receptor alpha-subunit gene expression and occurs independent of innervation, *J. Neurosci.*, 14: 2357-2364.

- Marchant, B., Stevenson, R., Vaishnav, S., Wilkinson, P., Ranjadayalan, K., and Timmis, A., (1994) Influence of the autonomic nervous system on circadian patterns of myocardial ischaemia - Comparison of stable angina with the early postinfarction period, *Br. Heart J.*, 71: 329-333.
- Marshall, I. G. and Parsons, S. M., (1987) The vesicular acetylcholine transport system, *Trend Neurosci.*, 10: 174-177.
- Martin, A. R. and Pilar, G., (1963) Dual mode of synaptic transmission in the avian ciliary ganglion, *J. Physiol.*, 168: 443-463.
- Martin, D. L., (1993) Short-term control of GABA synthesis, *Prog. Biophys. Molec. Biol.*, 60: 17-28.
- Martin, D. L. and Rimvall, K., (1993) Regulation of γ -aminobutyric acid synthesis in the brain, *J. Neurochem.*, 60: 395-407.
- Martinez, A. E. and Adler-Graschinsky, E., (1980) Release of norepinephrine induced by preganglionic stimulation of the isolated superior cervical ganglion of the cat, *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 212: 527-532.
- Matthews, G., Ayoub, G. S., and Heidelberg, R., (1994) Presynaptic inhibition by GABA is mediated via two distinct receptors with novel pharmacology, *J. Neurosci.*, 14: 1079-1090.
- McLachlan, E. M., (1975) Changes in statistical release parameters during prolonged stimulation, *J. Physiol.*, 253: 477-491.
- Mekhail, N. A., Estafanous, F. G., Vitullo, J. C., and Khairallah, P. A., (1990) Portal-like microcirculation in rat sympathetic ganglia, *Acta Anat.*, 138: 20-207.
- Mintz, I. M. and Bean, B. P., (1993) GABA_B receptor inhibition of P-type Ca²⁺ channels in central neurons, *Neuron*, 10: 889-898.
- Mirgorodsky, V. N. and Skok, V. I., (1969) Intracellular potentials recorded from a tonically active mammalian sympathetic ganglion, *Brain Res.*, 15: 570-572.
- Mochida, S. and Libet, B., (1985) Synaptic long-term enhancement (LTE) induced by a heterosynaptic neural input, *Brain Res.*, 329: 360-363.
- Mody, I., De Koninck, Y., Otis, T. S., and Soltesz, I., (1994) Bridging the cleft at GABA synapses in the brain, *Trends Neurosci.*, 17: 517-525.
- Moore, R. Y., (1983) The suprachiasmatic nucleus and the organization of a CNS circadian rhythm, *Trends Neurosci.*, 5: 404-407.
- Moore, R. Y. and Speh, (1993) GABA is the principal neurotransmitter in the circadian system, *Neurosci. Lett*, 150: 112-116.
- Moore-Ede, M. C., (1986) Physiology of the circadian timing system: predictive versus reactive homeostasis, *Am. J. Physiol.*, 250: R735-R752.
- Morales, M. A., Bachoo, M., Collier, B., and Polosa, C., (1994) Pre- and postsynaptic components of nicotinic long-term potentiation in the superior cervical ganglion of the cat, *J. Neurophysiol.*, 72: 819-824.
- Morishita, W. and Sastry, B. R., (1994) Presynaptic actions of GABA and baclofen in CA1 region of the guinea-pig hippocampus in vitro, *Neuroscience*, 61: 447-455.
- Mott, D. D. and Lewis, D. V., (1991) Facilitation of the induction of long-term potentiation by GABA_B receptors, *Science*, 252: 1718-1270.
- Murdoch Ritchie, J., (1992) Voltage-gated ion channels in Schwann cells and glia, *Trends Neurosci.*, 15: 345-351.

- Nagata, Y., Yoko, Y., and Tsukada, Y., (1966) Studies of free amino acid metabolism in excised cervical sympathetic ganglia from the rat, *J. Neurochem.*, 13: 1421-1431.
- Newberry, N. R., (1988) M1 and M2 receptors mediate different effects on synaptically evoked potentials of the rat superior cervical ganglion, *Neurosci. Lett.*, 88: 100-106.
- Newberry, N. R., Chesire, S. H., and Gilbert, M. J., (1991) Evidence that the 5-HT₃ receptors of the rat, mouse and guinea-pig superior cervical ganglion may be different, *Br. J. Pharmacol.*, 102: 615-620.
- Newland, C. F. and Cull-Candy, S. G., (1992) On the mechanism of action of picrotoxin on GABA receptor channels in dissociated sympathetic neurones of the rat, *J. Physiol.*, 447: 191-213.
- Newland, C. F., Colquhoun, D., and Cull-Candy, S. G., (1991) Single channels activated by high concentrations of GABA in superior cervical ganglion neurones of the rat, *J. Physiol.*, 432: 203-233.
- Nicholls, D. G., (1989) Release of glutamate, aspartate, and γ -aminobutyric acid from isolated nerve terminals, *J. Neurochem.*, 52: 331-341.
- Nicholls, D. and Attwell, D., (1990) The release and uptake of excitatory amino acids, *Trends Pharmacol. Sci.*, 11: 462-468.
- Nicoll, R. A., Malenka, R. C., and Kauer, J. A., (1990) Functional comparison of neurotransmitter receptor subtypes in mammalian central nervous system, *Physiol. Rev.*, 70: 513-565.
- Numao, Y. and Gilbey, M. P., (1987) Effects of aortic nerve stimulation on cervical sympathetic preganglionic neurones in the rat, *Brain Res.*, 401: 190-194.
- Oomori, Y., Iuchi, H., Nakaya, K., Tanaka, H., Ishikawa, K., Satoh, Y., and Ono, K., (1993) Gamma aminobutyric acid (GABA) immunoreactivity in the mouse adrenal gland, *Histochemistry*, 100: 203-213.
- Oset-Gasque, M. J., Cañadas Correas, S., Masso Cordoba, J. M., Gonzalez, and Gonzalez, M. P., (1985) Uptake of GABA by bovine adrenal medulla slices, *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol*, 329: 372-375.
- Otori, Y., Cagampang, F. A., Yamazaki, S., Inouye, S. T., Mano, T., and Tano, Y., (1993) Circadian rhythm of neuropeptide Y-like immunoreactivity in the iris-ciliary body of the rat., *Curr. Eye Res.*, 12: 803-807.
- Parducz, A., Dobo, E., Joo, F., and Wolff, J. R., (1992) Termination pattern and fine structural characteristics of GABA- and [Met]enkephalin-containing nerve fibers and synapses in the superior cervical ganglion of adult rat, *Neuroscience*, 49: 963-971.
- Parducz, A., Toldi, J., Joo, F., Siklos, L., and Wolff, J. R., (1987) Transient increase of calcium in pre- and postsynaptic organelles of rat superior cervical ganglion after tetanizing stimulation, *Neuroscience*, 23: 1057-1061.
- Polosa, C., (1968) Spontaneous activity of sympathetic preganglionic neurons. *Can. J. Physiol. Pharmacol.*, 46: 887-896.
- Prado, M. A. M., Gomez, M. V., and Collier, B., (1968) Mobilization of the readily releasable pool of acetylcholine from a sympathetic ganglion by tityustoxin in the presence of vesamicol, *J. Neurochem.*, 59: 544-552.
- Prigioni, I. and Russo, G., (1990) Intracellular recordings from "recurrent neurons" in the rat superior cervical ganglion, *J. Auton. Nerv. Syst.*, 31: 85-90.

- Pyner, S. and Coote, J. H., (1994) A comparison between the adult rat and neonate rat of the architecture of sympathetic preganglionic neurones projecting to the superior cervical ganglion, stellate ganglion and adrenal medulla, *J. Auton. Nerv. Syst.*, 48: 153-166.
- Pyner, S. and Coote, J. H., (1994) Evidence that sympathetic preganglionic neurones are arranged in target-specific columns in the thoracic spinal chord of the rat, *J. Comp. Neurol.*, 342: 15-22.
- Rand, J. B. and Johnson, C. D., (1981) A single-vial biphasic liquid extraction assay for choline acetyltransferase using [3H]choline, *Anal. Biochem.*, 116: 361-371.
- Rando, T. A., Bowers, C. W., and Zigmond, R. E., (1981) Localization of neurons in the rat spinal chord which project to the superior cervical ganglion, *J. Comp. Neurol.*, 196: 73-83.
- Reiter, R. J., (1991) Pineal melatonin: cell biology of its synthesis and of its physiological interactions *Endocr. Rev.*, 151-180.
- Romeo, H. E., Gonzalez, Solveyra, C., Vacas, M. I., Rosenstein. R. E., Barontini, M., and Cardinali, D. P., (1986) Origins of the sympathetic projections to rat thyroid and parathyroid glands, *J. Auton. Nerv. Syst.*, 17: 63-70.
- Rosenstein, R. E. and Cardinali, D. P., (1990) Central GABAergic mechanisms as targets for melatonin activity in brain, *Neurochem. Int.*, 17: 373-379.
- Ross, E. M., (1990) Pharmacodynamics: mechanisms of drug action and the relationship between drug concentration and effect En Goodman Gilman, A., Rall, T. W., Wics, A. S., and Taylor, P.(Eds.) *The pharmacological basis of therapeutics*, Pergamon Press, New York, 33-48.
- Rust, G., Burgunder, J. M., Lauterburg, T. E., and Cachelin, A. B., (1994) Expression of neuronal nicotinic acetylcholine receptor subunit genes in the rat autonomic nervous system, *Eur. J. Neurosci.*, 6: 478-485.
- Sacchi, O. and Belluzi, O., (1993) The action potential in mammalian neurons: new perspectives, *News Physiol. Sci.*, 8: 42-44.
- Sacchi, O. and Perri, V., (1971) Quantal release of acetylcholine from the nerve endings of the guinea-pig superior cervical ganglion, *Pflugers Arch.*, 329: 207-219.
- Sacchi, O. and Perri, V., (1973) Quantal mechanism of transmitter release during progressive depletion of the presynaptic stores at a ganglionic synapse. The action of hemicholinium-3 and thiamine deprivation, *J. Gen. Physiol.*, 61: 342-360.
- Sacchi, O. and Perri, V., (1976) Some properties of the transmitter release mechanism at the rat ganglionic synapse during potassium stimulation, *Brain Res.*, 107: 275-289.
- Sacchi, O., Consolo, S. P. G., Prigioni, I., Ladinsky, H., and Perri, V., (1978) Storage and release of acetylcholine in the isolated superior cervical ganglion of the rat, *Brain Res.*, 151: 443-456.
- Sakai, M., Kani, K., Yoshida, M., and Nagatsu, I., (1989) Dopaminergic cells in the superior cervical ganglion of the rat: light and electron microscopic study using an antibody against dopamine, *Neurosci. Lett.*, 96: 157-162.
- Sakatani, K., Chesler, M., Hassan, A. Z., Lee, M., and Young, W., (1993) Non-synaptic modulation of dorsal column conduction by endogenous GABA in neonatal rat spinal cord, *Brain Res.*, 622: 43-50.
- Scanziani, M., Capogna, M., Gähwiler, B. H., and Thompson, S. M., (1992) Presynaptic inhibition of miniature excitatory synaptic currents by baclofen and adenosine in the hippocampus, *Neuron*, 9: 919-927.
- Schlosser, W. and Franco, S., (1979) Modification of GABA-mediated depolarization of the cat superior cervical ganglion by pentobarbital and two benzodiazepines, *Neuropharmacology*, 18: 377-381.

- Schotzinger, R. J. and Landis, S. L., (1990) Acquisition of cholinergic and peptidergic properties by sympathetic innervation of rat sweat glands requires interaction with normal target, *Neuron*, 5: 91-100.
- Schotzinger, R., Yin, X. H., and Landis, S., (1990) Target determination of neurotransmitter phenotype in sympathetic neurons, *J. Neurobiol.*, 25: 620-639.
- Schousboe, A., Thorbek, P., Hertz, L., and Krogsgaard-Larsen, P., (1979) Effects of GABA analogs or restricted formation on GABA transport in astrocytes and brain cortex slices and on GABA receptor binding, *J. Neurochem.*, 33: 181-189.
- Schwartz, E. A., (1987) Depolarization without calcium can release γ -aminobutyric from a retinal neuron, *Science*, 238: 350-355.
- Scott, T. R. D. and Bennett, M. R., (1993) The effect of ions and second messengers on long-term potentiation of chemical transmission in avian ciliary ganglia, *Br. J. Pharmacol.*, 110: 461-469.
- Sheng, H., Dagne, G., Matsumoto, T., Miller, M. F., Forstermann, and Murad, F., (1993) Nitric oxide synthase in bovine superior cervical ganglion, *J. Neurochem.*, 61: 1120-1126.
- Sheng, H., Hughes, M. L., Murad, F., and Briggs, C.A., (1992) Evidence that nitric oxide mediates the cyclic GMP response to synaptic activity in the rat superior cervical ganglion, *Brain Res.*, 597: 343-345.
- Siaud, P., Mekaouche, M., Maurel, D., Givalois, L., and Ixart, G., (1994) Superior cervical ganglionectomy suppresses circadian corticotropic rhythms in male rats in the short term (5 days) and long term (10 days), *Brain Res.*, 652: 273-278.
- Sihra, T. S., Scott, I. G., and Nicholls, D. G., (1984) Ionophore A23187, verapamil, protonophores, and veratridine influence the release of γ -aminobutyric acid from synaptosomes by modulation of the plasma membrane potential rather than cytosolic calcium, *J. Neurochem.*, 43: 1624-1630.
- Skok, V. I., (1980) Ganglionic transmission: morphology and physiology En Kharkevich, D. A.(Ed.) Pharmacology of ganglionic transmission. *Handbook of experimental pharmacology*, Springer Verlag, Berlin Heidelberg, pp. 9-40.
- Skok, V. I., (1990) New insights on the mechanisms of action of ganglionic blocking agents, *News Physiol. Sci.* 5: 168-172.
- Smart, T. G. and Constanti, A., (1990) Differential effect of zinc on the vertebrate GABA_A receptor complex. *Br. J. Pharmacol.*, 99: 643-664.
- Smith, P. A., (1993) The autonomic ganglia and the modulation of ganglionic transmission, *Adv. Struct. Biol.*, 2: 245-316.
- Smith, P. A., (1994) Amphibian sympathetic ganglia: an owner's and operator's manual, *Prog. Neurobiol.*, 43: 439-510.
- Smolen, A. J., Wright, L. L., and Cunningham, T. J., (1983) Neuron numbers in the superior cervical ganglion of the rat: a critical comparison of methods for cell counting, *J. Neurocytol.*, 12: 739-750.
- Solis, J. M. and Nicoll, R. A., (1992) Postsynaptic action of endogenous GABA released by nipecotic acid in the hippocampus, *Neurosci. Lett.*, 147: 16-20.
- Somogyi, P., Hodgson, A. J., Chubb, I. W., Penke, B., and Erdei, A., (1985) Antisera to γ -aminobutyric acid. Immunocytochemical application to the central nervous system, *J. histochem. Cytochem.*, 33: 240-248.
- Stern, J. E. and Cardinali, D. P., (1994) Effect of parathyroid hormone and calcitonin on acetylcholine release in rat sympathetic superior cervical ganglion, *Brain Res.*, 650: 267-274.

- Takenaka, T., Kawakami, T., Hori, H., and Nadou, Y., (1994) Effect of neurotransmitters on axoplasmic transport - how adrenaline affects superior cervical ganglion cells, *Brain Res.*, 643: 81-85.
- Trouslard, J., Marsh, S. J., and Brown, D. A., (1993) Calcium entry through nicotinic receptor channels and calcium channels in cultured rat superior cervical ganglion cells, *J. Physiol.*, 486: 53-71.
- Tücek, S., (1985) Regulation of acetylcholine synthesis in the brain, *J. Neurochem.*, 44: 11-24.
- van den Pol, A. N. and Dudek, F. E., (1993) Cellular communication on the biological clock, the suprachiasmatic nucleus, *Neuroscience*, 56: 793-811.
- Verhoshvad, A. A., Steinbusch, H. W., Penke, B., and Joosten, H. W., (1981) Serotonin-immunoreactive cells in the superior cervical ganglion of the rat. Evidence for the existence of separate serotonin- and catecholamine-containing small ganglionic cells, *Brain Res.*, 212: 39-49.
- Volle, R. L., (1980a) Ganglionic actions of anticholinesterase agents, catecholamines, neuromuscular blocking agents and local anaesthetics En Pharmacology of ganglionic transmission. *Handbook of experimental pharmacology.*, Springer-Verlag, Berlin, pp. 385-390.
- Volle, R. L., (1980b) Nicotinic ganglionic-stimulating agents En Kharkevich, D. A.(Ed.) Pharmacology of Ganglionic transmission, *Handbook of experimental pharmacology* Springer-Verlag, Berlin, pp. 281-312.
- Voyvodic, J. T., (1989) Peripheral target regulation of dendritic geometry in the rat superior cervical ganglion. *J. Neurosci.*, 9: 1997-2010.
- Wall, P. D., (1995) Do nerve impulses penetrate terminal arborizations? A pre-presynaptic control mechanism, *Trends Neurosci.*, 18: 99-103.
- Walz, W., (1985) Uptake and release of amino acid transmitters. En Boulton, A. A., Baker, G. B., and Wood, J. D.(Eds.) *Neuromethods. Amino Acids*, Humana Press, Clifton, New Jersey, pp. 239-272.
- Waniewski, R. A. and Suria, A., (1977) Alterations on γ -aminobutyric acid content in the rat superior cervical ganglion and pineal gland. *Life Sciences*, 21: 1129-1142.
- Warren, W. S., Champney, T. H., and Cassone, V. M., (1994) The suprachiasmatic nucleus controls the circadian rhythm of heart rate via the sympathetic nervous system, *Physiol. Behav.*, 55: 1091-1099.
- Weight, F. F., Petzold, G., and Greengard, P., (1974) Guanosine 3',5'-monophosphate in sympathetic ganglia: increase associated with synaptic transmission, *Science*, 186: 942-944.
- Weisskopf, M. G., Castillo, P. E., Zalutsky, R. A., and Nicoll, R. A., (1994) Mediation of hippocampal mossy fiber long-term potentiation by cyclic AMP, *Science*, 265: 1878-1882.
- 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.
- Weldon, P., Bachoo, M., and Polosa, C., (1994) The role of tonic preganglionic neuron firing in the turnover of the large dense-cored vesicle store in sympathetic preganglionic nerve terminals, *Neuroscience*, 62: 531-538.
- Wessler, I., (1989) Control of transmitter release from the motor nerve by presynaptic nicotinic and muscarinic receptors, *Trends Pharmacol. Sci.*, 10: 110-114.
- Whittaker, V. P., (1990) The contribution of drugs and toxins to understanding of cholinergic function, *Trends Pharmacol. Sci.*, 11: 8-13.
- Wigström, W. H. and Gustafsson, B., (1983) Facilitated induction of long-lasting potentiation during blockade of inhibition, *Nature*, 301: 603-605.
- Williams, T. H., (1967) Electron microscopic evidence for an autonomic interneuron, *Nature*, 214: 309-310.

- Williams, S., Johnston, D., (1984) Muscarinic depression of long-term potentiation in CA3 hippocampal neurons, *Science*, 242: 84-87.
- Williams, T. H. and Palay, S. L., (1969) Ultrastructure of the small neurons in the superior cervical ganglion, *Brain Res.*, 15: 17-34.
- Wilson, W. S. and Cooper, J. R., (1969) The preparation of cholinergic synaptosomes from bovine superior cervical ganglia, *J. Neurochem.*, 19: 2779-2790.
- Wolff, J. R., Joo, F., Kasa, P., Storm-Mathiesen, J., Toldi, J., and Balcar, V. J., (1986) Presence of neurons with GABA-like immunoreactivity in the superior cervical ganglion of the rat, *Neurosci. Lett.*, 71: 157-162.
- Wolff, J. R., Kasa, P., Dobo, E., Parducz, A., and Joo, F., (1991) The GABAergic innervation of paravertebral sympathetic ganglia En Erdo, S. L.(Ed.) GABA outside the CNS, Springer Verlag, Berlin, pp. 45-63.
- Wolff, J. R., Kasa, P., Dobo, E., Romgens, H. J., Parducz, A., Joo, F., and Wolff, A., (1993) Distribution of GABA-immunoreactive nerve fibers and cells in the cervical and thoracic paravertebral sympathetic trunk of adult rat: evidence for an ascending feed-forward inhibition system, *J. Comp. Neurol.*, 334: 281-293.
- Wood, J. D. and Sidhu, H. S., (1987) A comparative study and partial characterization of multi-uptake systems for γ -aminobutyric acid, *J. Neurochem.*, 49: 1202-1208.
- Wu, R., McKenna, D. G., and McAfee, D. A., (1991) Age-related changes in the synaptic plasticity of rat superior cervical ganglia, *Brain Res.*, 542: 324-329.
- Young, J. A. C., Brown, D. A., and Schon, F., (1973) Autoradiographic localization of sites of [3H] γ -aminobutyric acid accumulation in peripheral autonomic ganglia, *Brain Res.*, 63: 479-486.
- Zengel, J. E., Magleby, K. L., Horn, J. P., McAfee, D. A., and Yarowsky, P. J., (1980) Facilitation, augmentation and potentiation of synaptic transmission in the superior cervical ganglion of the rabbit, *J. Gen. Physiol.*, 76: 213-231.
- Zhang, C., Bachoo, M., and Polosa, (1991) Naloxone-sensitive inhibition of nicotinic transmission in the superior cervical ganglion of the cat, *Brain Res.*, 548: 29-34.
- Zhang, C., Bachoo, M., and Polosa, C., (1993) Use-dependent fade and two-rate recovery of a naloxone-sensitive inhibition in the cat superior cervical ganglion, *Brain Res.*, 611: 279-285.
- Zhang, C., Bachoo, M., and Polosa, C., (1993) The receptors activated by exogenous and endogenous opioids in the superior cervical ganglion of the cat, *Brain Res.*, 622: 211-214.
- Zhang, S. J. and Jackson, M. B., (1995) GABA_A receptor activation and the excitability of nerve terminals in the rat posterior pituitary, *J. Physiol.*, 483: 583-595.
- Zigmond, R. E., Baldwin, C., and Bowers, C. W., (1985) Rapid recovery of pineal function after partial denervation: a possible role for heteroneuronal uptake of transmitter in modulating synaptic efficacy, *J. Neurosci.*, 5: 142-150.
- Zochodne, D. W., Low, P. A., and Dyck, P. J., (1989) Adrenergic sympathectomy ablates unmyelinated fibers in the rat "preganglionic" cervical sympathetic trunk, *Brain Res.*, 498: 221-228.

Parte de los resultados presentados en este trabajo de Tesis fueron volcados en las siguientes publicaciones:

Picrotoxin-sensitive receptors, mediate GABAergic modulation of synaptic plasticity in the superior cervical ganglion

G. R. González Burgos, F. I. Biali, D. P. Cardinali

Manuscrito en preparación.

Effect of γ -aminobutyric acid on synaptic transmission and long-term potentiation in rat superior cervical ganglion

G. R. González Burgos, F. I. Biali, L. C. Nicola Siri and D. P. Cardinali.

Brain Research, 658: 1-7 (1994).

Daily changes in presynaptic cholinergic activity of rat sympathetic superior cervical ganglion.

G. R. González Burgos, R. E. Rosenstein and D. P. Cardinali.

Brain Research, 636: 181-186 (1994).

Neurochemical evidence for a neuronal GABAergic system in the rat sympathetic superior cervical ganglion.

G. R. González Burgos, R. E. Rosenstein and D. P. Cardinali.

Journal of Neural Transmission [General Section], 89: 27-40 (1992)